

Translation
09/869382

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BET 99/1144	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/03304	International filing date (<i>day/month/year</i>) 28 December 1999 (28.12.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 30 December 1998 (30.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 27/447		
Applicant INSTITUT CURIE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 19 July 2000 (19.07.00)	Date of completion of this report 11 April 2001 (11.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/03304

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-53, as originally filed.
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims. Nos. 1-31, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/12-12/12, as originally filed.
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed. as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/03304

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-22, 24-30	YES
	Claims	1, 23, 31	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	2-22, 24-30	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

D1= WO-A-98/10274

D2= WO-A-97/09400

D3= EP-A-0 583 814

D4= HOURDET D. ET AL.: "Synthesis of thermoassociative copolymers", POLYMER, Vol. 38, N° 10, May 1997 (1997-05), pages 2535-2547.

Novelty:

1. D1 discloses a heat-sensitive medium with all of the features mentioned in Claim 1:

An electrolyte containing a dissolved block copolymer which enables the solution to change reversibly from a viscosity V_1 (at a temperature T_1) to a viscosity V_2 (at a temperature T_2), which is at least 100% greater than V_1 , said polymer containing two non-contiguous polymer segments with an LCST, and a polymer component soluble in the electrolyte (see Example 3; and page 26, line 8, to page 27, line 14).

The same considerations apply to documents D2-D4,

which likewise disclose a heat-sensitive medium covered by the definition provided in Claim 1:

D2, see page 3, line 4, to page 4, line 31;
D3, see page 2, lines 47-56, Table 1 and Table A;
D4, see Figure 1 and "Experimental".

It should be noted that the composition as defined in Claim 1 does not exclude the use of a salt or indeed separation at high temperatures.

The subject matter of Claim 1 therefore fails to satisfy the novelty requirement of PCT Article 33(2).

2. Furthermore, the following points must also be taken into account:
 - 2.1 According to the description (see page 17, line 30, particularly Example 9), polymers of the polyoxypropylene and polyoxybutylene types have an LCST (see also D3, page 8, lines 26 and 27).
 - 2.2 The scope of Claim 1 includes a heat-sensitive medium containing a set of block copolymers. There is no restriction as to the use of that medium (for separation by electrophoresis, for example).
 - 2.3 The copolymers of Claim 1 are not confined to non-charged polymers.
3. D1 also discloses the use defined in Claim 23 and a device as defined in Claim 31. Consequently, these claims likewise lack novelty.

Inventive Step:

It is currently difficult to determine which of the dependent claims contain a feature which, in combination with the features of any one claim to which they refer, constitutes subject matter satisfying the PCT requirement of an inventive step; in other words, it is difficult to identify the technical problem which might be solved in an inventive manner by those features.

Industrial Applicability:

Industrial applicability is acknowledged (PCT Article 33(4)).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. The independent claims have not been drafted in the two-part form defined in PCT Rule 6.3(b); however, in this case it seems appropriate to use the two-part form, with features which are known in combination from prior art (D1) appearing in the preamble (PCT Rule 6.3(b)(i)) and the remaining features in the characterising part (PCT Rule 6.3(b)(ii)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 6 in so far as the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject matter in terms of the result to be attained, which simply amounts to stating the fundamental problem to be solved by the invention. The technical features required to attain that result and to solve the problem must also be mentioned (e.g. by indicating the specific polymers with which the result is attained).
2. In the light of Examples 1 and 2, it would appear that the structure of the block copolymer should be defined as follows:
"two non-contiguous polymer segments... **linked to each other by** a polymer segment is soluble in...".

1.5
T

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 19 APR 2001

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 99/1144	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR99/03304	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28/12/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 30/12/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N27/447		
Déposant INSTITUT CURIE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/07/2000	Date d'achèvement du présent rapport 11.04.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Komenda, P N° de téléphone +49 89 2399 2777 

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-53 version initiale

Revendications, N°:

1-31 version initiale

Dessins, feuilles:

1/12-12/12 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/03304

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n° :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 2-22,24-30
	Non : Revendications 1,23,31
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 2-22,24-30
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-31
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Point V:

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 = WO 98/10274

D2 = WO 97/09400

D3 = EP-A-0 583 814

D4 = HOURDET D ET AL: 'Synthesis of thermoassociative copolymers'
POLYMER, vol. 38, no. 10, mai 1997 (1997-05), page 2535-2547

N:

1. Le document D1 divulgue un milieu thermosensible avec toutes les caractéristiques mentionnées dans la revendication 1:

Un électrolyte dans lequel est dissous un copolymère bloc qui confère à la solution la faculté de transiter réversiblement d'un état de viscosité V_1 (à une température T_1) vers un état de viscosité V_2 supérieure d'au moins 100 % à V_1 (à une température T_2), le polymère comprenant deux segments polymériques non-contigus présentant une LCST et un élément polymérique soluble dans l'électrolyte (voir exemple 3 et page 26, ligne 8 à page 27, ligne 14).

Les mêmes considérations s'appliquent aux documents D2 à D4 qui divulguent aussi un milieu thermosensible qui est couvert par la définition de la revendication 1:

D2, voir page 3, ligne 4 à page 4, ligne 31;

D3, voir page 2, lignes 47 à 56, table 1 et table A;

D4, voir figure 1 et "Experimental".

Il est à noter ici, que la composition comme définie dans la revendication 1 n'exclut ni l'utilisation d'un sel ni la séparation aux températures hautes.

Donc l'objet de la revendication 1 n'est pas conforme au critère de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT.

2. De plus, les points suivants doivent être aussi pris en considération:
 - 2.1 Selon la description (voir page 17, ligne 30, en particulier exemple 9) les polymères de type polyoxypropylène et polyoxybutylène présentent de LCST (voir également D3, page 8, lignes 26 et 27).
 - 2.2 L'étendue de la revendication 1 couvre un milieu thermosensible comprenant un ensemble de copolymères blocs. Il n'y a aucune restriction concernant l'utilisation de ce milieu (par exemple pour la séparation par électrophorèse).
 - 2.3 Les copolymères de la revendication 1 ne sont pas limités aux polymères non-chargés.
 3. Le document D1 divulgue aussi l'utilisation telle que définie dans la revendication 23 et un dispositif tel que défini dans la revendication 31. Ces revendications manquent donc aussi de nouveauté.
- AI:** Il n'est pas évident à l'heure actuelle de savoir, quelles revendications dépendantes contiennent une caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications à laquelle elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne l'activité inventive c'est-à-dire, pour quel problème technique ces caractéristiques pourraient constituer une solution inventive.
- AI:** L'application industrielle est reconnue (Article 33(4) PCT).

Point VII:

1. Les revendications indépendantes ne sont pas présentées en deux parties comme prévu par la règle 6.3 b) PCT, alors qu'une telle présentation semblerait appropriée en l'espèce, les caractéristiques connues en combinaison de l'état de la technique (document D1) figurant dans le préambule (règle 6.3 b) i) PCT) et les caractéristiques restantes figurant dans la partie caractérisante (règle 6.3 b) ii) PCT).

Point VIII:

1. La revendication 1 ne satisfait pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est recherchée n'est pas clairement défini. La revendication tente de définir cet objet par le résultat à atteindre, ce qui revient simplement à énoncer le problème fondamental que doit résoudre l'invention. Les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat et résoudre le problème doivent être ajoutées (cf. par l'introduction des polymères spécifiques avec lesquels on atteint ce résultat).
2. Au vu des exemples 1 et 2 il apparaît que la structure du copolymère bloc doit être définie comme suivant:
"deux segments polymériques non-contigus...**reliés entre eux par un segment** polymérique est soluble dans...".



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ :

F01N 27/447

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 00/40958

(43) Date de publication internationale:

13 juillet 2000 (13.07.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/03304

(22) Date de dépôt international: 28 décembre 1999 (28.12.99)

(30) Données relatives à la priorité:

98/16676

30 décembre 1998 (30.12.98)

FR

(71) Déposants (*pour tous les Etats désignés sauf US*): INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE-PARIS VI [FR/FR]; Tour Centrale, 4, place Jussieu, F-75005 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*US seulement*): VIOVY, Jean-Louis [FR/FR]; 26, rue de l'Espérance, F-75013 Paris (FR). HOURDET, Dominique [FR/FR]; 25, rue des Tournafis, F-94360 Bry sur Marne (FR). SUDOR, Jan [CZ/FR]; 39, avenue des Gobelins, F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataire: OBOLENSKY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: HEAT-SENSITIVE MEDIUM FOR SEPARATING SPECIES IN A SEPARATOR CHANNEL

(54) Titre: MILIEU THERMOSENSIBLE POUR LA SEPARATION D'ESPECES AU SEIN D'UN CANAL DE SEPARATION

(57) Abstract

The invention concerns a medium comprising an electrolyte wherein is dissolved at least an assembly of block copolymers characterised in that said block copolymers: are present in said electrolyte at a concentration level to provide said medium with the property of reversibly passing from a state of viscosity V1, obtained at a temperature T1, to a viscosity state V2 greater by at least 100 % than V1, obtained at a temperature T2, and comprise in their structure at least: two non-contiguous polymeric segments having in said electrolyte a lower critical solubility temperature (LCST) and having an average number of atoms along their skeleton more than 50; and a polymeric segment soluble in the electrolyte at temperatures T1 and T2. The invention also concerns the use of said medium for separating analytes.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un milieu comprenant un électrolyte dans lequel est dissout au moins un ensemble de copolymères blocs caractérisé en ce que lesdits copolymères blocs sont présents dans ledit électrolyte à une concentration suffisante pour conférer audit milieu la faculté de transiter réversiblement d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100% à V1, obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20 °C à T1 et comprenant dans leur structure au moins deux segments polymériques non-contigus présentant dans ledit électrolyte une LCST et possédant un nombre moyen d'atomes le long de leur squelette supérieur à 50 et un segment polymérique soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2. Elle a également pour objet l'utilisation dudit milieu à des fins séparatives d'analytes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Caméroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

MILIEU THERMOSENSIBLE POUR LA SEPARATION D'ESPECES AU SEIN D'UN CANAL DE SEPARATION.

La présente invention concerne le domaine de la séparation, de l'identification et/ou de l'analyse de particules, de molécules ou de macromolécules, et plus particulièrement d'acides nucléiques au sein d'un canal, par exemple dans un système microfluidique ou plus particulièrement dans le cadre de l'électrophorèse capillaire.

L'électrophorèse en gel a de très nombreuses applications pour la séparation de particules, de molécules et de macromolécules chargées, et en particulier de macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides. Une application particulièrement importante est le séquençage, c'est à dire la lecture du code génétique de l'ADN. Elle se pratique le plus souvent dans des gels plans et macroscopiques (d'épaisseur de l'ordre de 1 à plusieurs mm), composés d'agarose ou de polyacrylamide. Plus récemment, d'autres gels dérivés de l'acrylamide et toute une série de gels d'acrylate ou de méthacrylate ont été proposés pour améliorer telle ou telle propriété du gel. En particulier, dans le brevet US 5 164 057, il a été proposé l'utilisation de polymères présentant en solution une température critique de solubilité (abrégié par la suite LCST dans la présente demande), pour contrôler le caractère hydrophile/hydrophobe au sein d'un gel réticulé de façon permanente et irréversible, utilisé en électrophorèse.

Malgré ces améliorations, l'électrophorèse planaire en gel présente plusieurs inconvénients.

Elle requiert un travail manuel relativement important pour la préparation du gel, qui ne peut être utilisé qu'une fois, et pour la révélation ultérieure des distances de migration. La reproductibilité des expériences d'un gel à l'autre est difficile à obtenir, car les propriétés du gel dépendent des conditions exactes de la préparation. Etant donnée la production de chaleur liée au courant, des tensions assez faibles doivent être employées, conduisant à des temps de séparation longs. Enfin, l'électrophorèse planaire est difficile à automatiser et à quantifier. Pour ces différentes raisons, l'électrophorèse en gel macroscopique

tend à être supplantée par des techniques dans lesquelles la séparation ou plus généralement l'analyse des constituants d'un échantillon s'effectue dans des canaux de grand rapport surface/volume, comme des capillaires cylindriques, ou des canaux de section submillimétrique planaires préparés au sein d'un matériau (appelés "puces", microcanaux ou systèmes microfluidiques). Des exemples de telles séparations sont décrits par exemple dans "Capillary electrophoresis in analytical biotechnology", Righetti ed., CRC press, 1996, ou dans Cheng, J. et coll., (1996), Molecular Diagnosis, 1, 183-200.

Dans ce qui suit, on désignera l'ensemble des méthodes mettant en jeu une séparation électrophorétique dans un canal ou plusieurs canaux dont l'une des dimensions au moins est de dimension submillimétrique, sous le nom "d'électrophorèse capillaire" (EC). On désignera, plus généralement, par "système microfluidique", tout système dans lequel l'analyse d'espèces est effectuée grâce au transport des dites espèces et/ou de fluides au sein d'un canal ou d'un ensemble de canaux dont l'une des dimensions au moins est submillimétrique.

L'EC et les systèmes microfluidiques permettent des séparations plus rapides et plus résolutes que les gels, ne réclament pas de milieu anticonvectif, et leurs propriétés ont été utilisées largement pour effectuer des séparations d'ions en milieu liquide.

Toutefois, une part importante des analytes que l'on souhaite séparer par l'électrophorèse, et notamment ceux rencontrés en biologie, ont, en milieux visqueux homogène, une mobilité indépendante de leur taille et ne peuvent être valablement séparés qu'au sein d'un milieu présentant des obstacles. Les gels employés en électrophorèse traditionnelle, notamment, sont formés par des portions de chaînes macromoléculaires ou des fibres connectées entre elles et intraversables par les analytes. Ces derniers doivent se frayer un chemin le long des pores présents entre les segments macromoléculaires du gel, ce qui donne lieu à la séparation voulue. Dans les premières applications de l'EC à l'ADN et aux protéines, on a souvent eu recours à des gels permanents réticulés à l'intérieur du capillaire. Ceci présente de nombreux inconvénients: la préparation d'un gel bien homogène et sans bulle à l'intérieur d'un capillaire est délicate. Le

gel se dégrade relativement vite par hydrolyse, et est " pollué " par des impuretés présentes dans les échantillons, qui finissent par dégrader les performances de la séparation, ou même par boucher le capillaire après un nombre limité de séparations. Etant donné le prix de revient et/ou la difficulté de fabrication d'un capillaire rempli de gel, ce défaut rend le coût de cette approche prohibitif.

A l'heure actuelle, la grande majorité des séparations de macromolécules biologiques effectuées en EC ont recours à des solutions de polymères hydrosolubles linéaires enchevêtrés présentant l'avantage de pouvoir être remplacées aussi souvent que nécessaire. A concentration assez élevée, soit significativement au dessus du seuil d'enchevêtrement, les différents polymères de la solution s'enchevêtrent et constituent un réseau transitoire continu d'obstacles topologiques qui ne peuvent être traversés par les analytes, conférant ainsi à la solution des propriétés de séparation électrophorétique.

Ces solutions de polymères hydrosolubles donnent satisfaction dans certaines applications, mais présentent également de nombreuses limitations.

La première de ces limitations est l'électroosmose, un mouvement d'ensemble du milieu de séparation dû à la présence de charges sur les parois du capillaire ou du canal. Ce mouvement étant souvent variable dans le temps et non-uniforme, il nuit à la reproductibilité des mesures et à la résolution. De nombreuses méthodes ont été proposées pour le combattre, comme le traitement de la surface des capillaires par adsorption d'espèces essentiellement neutres sur les parois du canal de séparation préalablement à la séparation proprement dite (Wiktorowicz et coll., Electrophoresis, 11, 769, 1990, Tsuji et coll., J. Chromatogr. 594, 317 (1992), ou par le traitement du capillaire par une solution acide (Fung et coll., Anal. Chem. 67, 1913, (1995)). Ces méthodes présentent l'avantage d'être peu coûteuses et de pouvoir être répétées plusieurs fois pour régénérer un capillaire, mais ne réduisent souvent l'électroosmose que partiellement. Il a été également proposé des méthodes de greffage irréversible d'une couche polymérique essentiellement neutre sur les parois, comme par exemple décrit dans US 4 680 201. Des capillaires traités prêts à l'emploi sont ainsi disponibles commercialement. Ces capillaires traités de façon irréversible conduisent à une bonne réduction de l'électroosmose pour un certain nombre de séparations mais leur durée de vie est limitée et leur coût élevé.

Un autre inconvénient majeur des séparations électrocinétiques en solutions de polymères est que la résolution et la gamme de tailles séparable sont meilleures avec des solutions relativement concentrées et de fortes masses moléculaires (Mitnik et coll., J. Chrom. A, 710, 309 (1995); Goetzinger et coll., Electrophoresis, 19, 242, 1998)). Ceci est attribué à des déformations de la matrice de séparation qui limitent la résolution pour les analytes de grande taille et qui sont d'autant plus importantes que la masse moléculaire de la matrice est petite et que sa concentration est faible. Par contre, la viscosité d'une solution de polymères augmente très rapidement quand on augmente la masse moléculaire et la concentration. On est donc limité dans l'application des solutions de polymères hydrosolubles enchevêtrés par la très grande difficulté, et en dernier ressort l'impossibilité, qu'il y a à introduire dans un capillaire de dimensions faibles (typiquement moins de 100 micromètres) une solution de très grande viscosité. Enfin, il faut noter que la gamme de séparation accessible à l'électrophorèse capillaire peut être étendue vers les plus grandes tailles par l'utilisation de champs pulsés. On se heurte alors à des phénomènes d'agrégation de l'ADN qui limitent la portée de l'amélioration, et qui sont eux aussi d'autant plus forts que la viscosité du milieu est faible.

Afin de résoudre le dilemme posé par la recherche d'une faible viscosité pour l'injection du milieu de séparation dans le canal, et d'obstacles topologiques résistants pour la séparation, qui conduisent de fait à une forte viscosité, certains auteurs ont proposé d'utiliser un milieu polymère dont la viscosité diminue fortement au cours d'une élévation de température. Ce type de milieu a pour avantage de permettre l'injection dudit milieu dans le capillaire à haute température dans un état de faible viscosité, et la séparation à plus basse température dans un état de plus forte viscosité présentant de bonnes performances de séparation, comme cela est couramment effectué en électrophorèse en gel, en particulier avec l'agarose.

Dans les demandes WO 94/10561 et WO 95/30782 sont notamment proposés des milieux permettant une injection plus facile par élévation de la température. Sont essentiellement décrits dans ces demandes de brevet des microgels capables de diminuer de volume à haute température (conduisant ainsi

à une solution diluée de particules discontinues de faible viscosité) et de se gonfler à basse température jusqu'à occuper entièrement le canal de séparation (conférant ainsi au milieu un caractère gélifié et de bonnes propriétés de séparation).

Toutefois, ces milieux de séparation présentent une viscosité qui décroît de façon plus ou moins rapide avec la température; il est donc nécessaire de les introduire dans le capillaire à une température supérieure à la température à laquelle s'effectue la séparation, ce qui peut présenter divers inconvénients. D'une part, dans les appareils d'électrophorèse capillaire, il est très difficile de thermostatier la totalité du capillaire, et il est donc difficile de mettre en œuvre de façon automatique un polymère qui ne serait injectable qu'à une température nettement supérieure à la température ambiante. On pourrait envisager une solution peu visqueuse à la température ambiante, et disposant d'une forte viscosité et de bonnes propriétés de séparation à une température plus basse, mais cela implique d'effectuer les séparations à basses températures, ce qui n'est pas possible pour tous les analytes. En particulier, on sait que pour le séquençage de l'ADN, une résolution optimale des "compressions" est obtenue à relativement haute température (de l'ordre de 50-60°C), ce qui est incompatible avec le principe précédent.

La demande WO 98/10274 propose pour sa part un milieu de séparation moléculaire comportant au moins un type de copolymères blocs qui est en solution à une première température et dans un état de type gel à une seconde température. Ce milieu comprend en outre un tampon qui a pour rôle de dissoudre le copolymère bloc à une première température, et de le faire transiter vers l'état gel à la dite seconde température sans interrompre le processus de séparation, et sans empêcher le retour à un état soluble lors du retour à la dite première température. Plus spécifiquement, les polymères décrits sont des polymères triblocs de faibles masses moléculaires (typiquement inférieures à 20 000), de la famille polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène (POE-POP-POE) et plus spécifiquement encore le (POE₉₉-POP₆₉-POE₉₉, où les indices représentent les nombres de monomères de chaque bloc) (nom commercial "Pluronic F127"). A basse température, les deux segments POE en extrémité des systèmes triblocs sont hydrosolubles, et étant donnée la faible masse moléculaire du copolymère,

les solutions sont relativement peu visqueuses jusqu'à une concentration élevée. En élevant la température aux alentours de de 15-25°C, le segment central POP central devient plus hydrophobe, et ces polymères s'associent pour constituer au sein du milieu un réseau tridimensionnel organisé de structure prédéterminée, qui confère au milieu l'apparence et la consistance d'un gel. Malheureusement, ce mécanisme présente pour l'électrophorèse plusieurs inconvénients. D'une part, il ne donne lieu à un état gel doué de bonnes propriétés de séparation électrophorétique qu'à des concentrations en polymère importantes, supérieures à 15 g/100ml voire à 20g/100ml, ce qui conduit à une forte friction et à des temps de migration longs. Par ailleurs, la dépendance des propriétés en fonction de la vitesse de changement de température rend la reproductibilité des résultats aléatoire. Enfin, les produits proposés dans WO 98/10274 présentent une viscosité faible soit en dessous de la température ambiante soit au-dessus de la température ambiante, et présentent un état gel intéressant pour la séparation électrophorétique au voisinage de la température ambiante (25°C), ce qui n'est intéressant ni pour remplir commodément les capillaires, ni pour des applications comme le séquençage de l'ADN.

Des copolymères triblocs présentant la même structure, avec des masses moléculaires différentes, donnent lieu à des propriétés physiques comparables et à des performances en séparation comparables ou inférieures au F127. Est également décrit dans WO 98/10274 un polymère de type $\text{POB}_{12}\text{-POE}_{260}\text{-POB}_{12}$, où POB signifie polyoxybutylène. Contrairement aux polymères précédents, ces polymères donnent lieu à un état peu visqueux à une température supérieure à la température ambiante, et à une gélification par abaissement de température au voisinage de la température ambiante.

Il est à noter qu'il existe d'autres polymères pouvant présenter dans l'eau un caractère thermoviscosifiant ou thermoépaississant. Dans la demande de brevet EP 583 814 sont décrits des polymères thermoviscosifiants, qui contiennent d'une part des parties hydrophiles du type de chaîne prépolymère ou macromonomère qui ne présentent pas de LCST dans une gamme de température utile, et d'autre part des parties hydrophiles du type de chaîne prépolymère ou macromonomères qui présentent une LCST dans la dite gamme de température utile. Cependant, les polymères de ce type ne peuvent être

utilisés avec de bonnes performances en tant que milieu de séparation pour l'électrophorèse, pour plusieurs raisons. D'une part, ils n'exercent leur effet thermoviscosifiant qu'en présence d'une quantité de sel dans la solution relativement importante, comprise entre de l'ordre de 0,4 M et plusieurs M. Cette propriété est très handicapante pour l'électrophorèse, car l'utilisation de solutions fortement salines conduit à un échauffement de la solution et interdit l'usage de champs électriques forts. Les séparations dans des milieux fortement salins sont donc lentes et peu résolutive. D'autre part, ils présentent un squelette électriquement chargé : si on souhaite les utiliser comme milieu de séparation électrophorétique, les polymères constituant la matrice eux-mêmes risquent d'être mis en mouvement, ou de donner lieu à de l'électroendosmose, perturbant la séparation qu'on souhaitait obtenir par interaction entre les analytes et des obstacles fixes. Troisièmement, ces milieux sont prévus pour donner lieu à une thermoviscosification, ou pour maintenir une viscosité approximativement constante, dans une gamme de température unique et relativement large englobant la LCST des dites parties hydrophiles à LCST. Or, il serait particulièrement avantageux pour l'électrophorèse, de disposer de deux gammes de températures utiles bien distinctes, l'une pour l'injection au sein de capillaire du milieu de séparation, et l'autre pour la séparation électrophorétique proprement dite, la dite séparation s'effectuant alors que le milieu est maintenu à une température approximativement constante.

En fait, la plupart des milieux synthétiques proposés jusqu'à présent comme pouvant donner lieu à un effet thermoviscosifiant présentent un squelette chargé (L'allore et al., Colloid. Polym. Sci., 273, 1163-1173 (1995), Hourdet, Polymer preprints, 34, 972-973 (1993), Hourdet et al., Polymer, 38, 2535-2547 (1997)). En effet, une façon habituelle pour conférer des propriétés thermoviscosifiantes à un polymère consiste à construire une molécule présentant des portions de chaînes hydrophiles à toute température qui aident à maintenir la molécule en solution, et des portions de chaînes à LCST qui conduisent par élévation de température à une interaction attractive entre chaînes, responsables de la viscosification. Pour obtenir une bonne viscosification, il serait souhaitable de multiplier la proportion des portions de chaînes à LCST et leur force d'interaction, mais une telle augmentation tend

aussi à induire une séparation de phase macroscopique, qui réduit au contraire la viscosité. La présence de charges électriques sur le squelette aide à empêcher la séparation de phases macroscopique par effet d'entropie des contre-ions ou de répulsion électrostatique, et permet donc de faire entrer dans la composition des polymères une quantité de portions à LCST suffisante pour donner une viscosification, tout en empêchant la séparation de phases macroscopique. On voit donc qu'il est particulièrement difficile de constituer des milieux thermoviscosifiants à base de polymères à squelette hydrophile neutre. Quelques exemples de tels milieux ont été décrits dans de Vos et coll., Polymer, 35, 2644 (1994), mais ils ne donnent lieu à thermoviscosification qu'en présence d'un fort taux de sel et à des températures de plus de 80°C, ce qui les rend également inutilisables pour la plupart des applications envisageables en tant que matrice de séparation, et en particulier pour l'électrophorèse.

En conséquence, bien que de nombreux types de milieux, thermosensibles ou non, aient été proposés comme matrices pour la séparation électrocinétique d'espèces au sein d'un canal, et que de nombreux types de milieux thermosensibles aient également été proposés pour d'autres applications, il n'existe pas à l'heure actuelle de milieux présentant pour les dites séparations des propriétés optimales.

La présente invention a précisément pour objet de proposer un nouveau type de milieux de séparation dont il s'avère possible d'optimiser les propriétés en fonction de la taille des analytes que l'on cherche à séparer à travers la sélection d'un copolymère spécifique.

Au sens de l'invention, on entend couvrir sous l'expression séparation, toute méthode visant à séparer, identifier ou analyser, l'ensemble ou certaines des espèces contenues dans un mélange, les dites espèces étant communément appelées " analytes ".

Cette séparation peut ainsi être réalisée au sein d'un canal dans un système microfluidique ou dans le cadre de l'électrophorèse.

L'invention est particulièrement avantageuse dans le cas de séparations électrocinétiques.

On entend couvrir sous l'expression séparation électrocinétique, toute méthode visant à séparer l'ensemble ou certaines des espèces contenues dans un mélange, les dites espèces étant communément appelées " analytes ", en les faisant migrer au sein d'un milieu sous l'action d'un champ électrique, que le champ exerce son action motrice sur les analytes de façon directe ou indirecte, par exemple par l'intermédiaire d'un déplacement du milieu lui-même, comme dans l'électrochromatographie, ou d'un déplacement d'espèces annexes telles que des micelles, dans le cas de l'électrochromatographie micellaire, ou par n'importe quelle combinaison d'actions directes et indirectes. Sera également considérée comme une méthode de séparation électrocinétique selon l'invention toute méthode de séparation dans laquelle la dite action du champ électrique est combinée à une autre action motrice d'origine non-électrique.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un milieu thermosensible pour la séparation d'espèces au sein d'un canal de séparation, ledit milieu comprenant un électrolyte dans lequel est dissous au moins un ensemble de copolymère blocs caractérisé en ce que lesdits copolymères blocs :

- sont présents dans ledit électrolyte à une concentration suffisante pour conférer audit milieu la faculté de transiter réversiblement d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100% à V1, obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20°C à T 1 et

- comprennent dans leur structure au moins :

- deux segments polymériques non-contigus présentant dans ledit électrolyte une LCST et possédant un nombre moyen d'atomes le long de leur squelette supérieur à 50 et

- un segment polymérique soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.

Au titre de l'invention, sauf mention explicite toutes les moyennes sur des ensembles de chaînes ou sur des ensembles de segments polymériques, comme la masse moléculaire moyenne, ou le nombre moyen d'atomes le long du squelette, ou encore le nombre moyen de greffons dans le

cas d'un polymère en peigne, s'entendent comme des moyennes en masse au sens habituel de la physique des polymères.

Le milieu de séparation revendiqué possède donc la capacité de transiter de façon réversible entre un état fluide de viscosité assez basse pour permettre son introduction dans le dit canal, obtenu à une température T1, et un état de viscosité notablement supérieure, et en tout état de cause au moins deux fois supérieure, obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20°C à la température T1. A la température T2, ledit milieu de séparation est doué de propriétés de séparation significatives pour des espèces dans une gamme de composition chimique et de taille prédéfinies.

Par " température T1 ", on entend dans le cadre de l'invention, soit une température précise, soit une gamme de températures relativement étroite, de largeur typiquement de l'ordre de 10°C, utile pour l'exécution d'une opération particulière relative au procédé de séparation, et en particulier pour l'introduction de la matrice de séparation selon l'invention dans le canal de séparation. Selon une variante préférée de l'invention, la température T1 est comprise entre environ 15 et 30°C. De même, par " température T2 ", on entend dans le cadre de l'invention, soit une température précise, soit une gamme de températures relativement étroite, de largeur typiquement de l'ordre de 10°C, utile pour l'exécution d'une autre opération particulière relative au procédé de séparation, et en particulier pour l'étape de séparation des analytes au sein du canal. Selon une variante préférée de l'invention, utile pour le séquençage de l'ADN, cette température ou gamme de température T2 est comprise entre environ 40 et 80°C.

Selon une variante préférée de l'invention, la LCST d'une fraction significative des dits segments présentant une LCST est comprise entre les températures T1 et T2 et plus préférentiellement entre environ 20 et 50°C.

Au sens de l'invention, on entend désigner par électrolyte, un milieu condensé capable de conduire les ions. Dans le cas le plus courant, ce milieu est un milieu aqueux tamponné, comme les tampons à base de phosphate, de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), de Borate, de N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-3-aminopropane sulfonic acid (TAPS), d'histidine, de lysine, etc... De nombreux exemples de tampons utilisables en électrophorèse

sont connus de l'homme de l'art, et un certain nombre d'entre eux sont décrits par exemple dans " Sambrook et coll., " Molecular Cloning: a laboratory manual ", Cold Spring Harbor Lab, New York, 1989. Cependant, tous types d'électrolyte peuvent être utilisés dans le cadre de l'invention notamment les solvants hydroorganiques comme à titre d'exemple les mélanges eau-acétonitrile, eau-formamide ou eau-urée, les solvants organiques polaires tels que, encore à titre d'exemple, la N-méthylformamide. Particulièrement utiles dans le cadre de l'invention sont les électrolytes dits "tampons de séquençage", constitués par un tampon aqueux à pH alcalin additionné d'une proportion notable d'urée et/ou de formamide.

Au sens de l'invention on entend désigner sous le terme "espèces" de manière générale des analytes. Ces analytes peuvent être des particules, organelles ou cellules, des espèces moléculaires ou macromoléculaires, et en particulier des macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les analogues d'acides nucléiques obtenus par synthèse ou modification chimique, les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides dont on souhaite la séparation totale ou partielle au cours de leur migration électrocinétique au sein dudit milieu de séparation.

Au titre de l'invention, on entend désigner par "segment polymérique" ou "segment" un ensemble de monomères liés entre eux de façon covalente et présentant des propriétés physicochimiques spécifiques, en particulier en ce qui concerne la solvation. Un exemple de segment polymérique au sens de l'invention est donné par un enchaînement de monomères tous identiques (segment homopolymère), ou un copolymère ne présentant pas de corrélation de composition significative sur des longueurs de plus de quelques monomères (segment de type copolymère statistique).

Au sens de l'invention, on entend désigner par copolymère-bloc, un copolymère constitué de segments polymériques de compositions significativement différentes, reliés entre eux de façon covalente. Le copolymère-bloc se définit par le fait que chacun des segments comporte un nombre suffisant de monomères pour présenter au sein de l'électrolyte des propriétés physicochimiques et en particulier de solvation, comparables à celles d'un homopolymère de même composition et de même taille. Il s'oppose au polymère

statistique, dans lequel les différents types de monomères se succèdent de façon essentiellement aléatoire, et confèrent localement à la chaîne des propriétés globales, différentes de celles des homopolymères de chacune des espèces en question. La taille des segments homopolymères nécessaires pour
5 obtenir ce caractère bloc peut varier en fonction des types de monomères et de l'électrolyte, mais elle est typiquement de quelques dizaines d'atomes le long du squelette dudit segment. Il est à noter qu'on peut constituer un copolymère bloc au sens de l'invention, dans lequel partie ou totalité des segments sont eux-mêmes constitués par un copolymère de type statistique, , dans la mesure où on
10 peut distinguer au sein du dit copolymère bloc des zones ou segments de taille et de différence de composition chimique suffisantes pour donner lieu d'un segment à l'autre à une variation significative des propriétés physicochimiques et en particulier de solvation. Enfin, on entend désigner par "segments polymériques non-contigus" au sein d'un polymère bloc deux segments reliés
15 entre eux par un segment polymérique de nature différente.

Les copolymères blocs convenant à l'invention possèdent la particularité d'associer dans leurs structures, au moins deux types de segments.

Le premier type de segment est soluble dans l'électrolyte utilisé
20 pour la séparation aux deux températures T1 et T2 d'utilisation du milieu revendiqué et préférentiellement ne présente pas dans ledit électrolyte de LCST. Dans le présente texte, on entend par soluble faire référence à une solubilité dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.

En revanche, le second type de segments est doté d'une LCST
25 dans l'électrolyte utilisé pour la séparation. Plus précisément, ce type de segments est essentiellement soluble dans ledit électrolyte dans une gamme de températures basses, et essentiellement insoluble dans ledit électrolyte dans une gamme de températures hautes. La limite entre ces deux gammes de température est appelée "température minimale de démixion" ou plus
30 communément "LCST".

De part la présence de ces segments à LCST au niveau de leur structure, les copolymères mis en œuvre selon l'invention possèdent la propriété de constituer, à basse température, une solution enchevêtrée macroscopiquement

homogène, au sein de laquelle les interactions entre différentes molécules de polymères sont essentiellement répulsives et de donner lieu, suite à une élévation de température, à des interactions attractives entre certaines de leurs parties qui renforcent les interactions d'enchevêtrement entre chaînes.

5 Selon un mode préféré de l'invention, le nombre moyen de segments à LCST par copolymère est supérieur à 2 et de préférence supérieur à 5, et plus préférentiellement encore compris entre 8 et 40. Grâce à ce grand nombre de segments, capables d'interagir de façon attractive, un copolymère donné peut interagir avec de nombreux autres copolymères, ce qui confère au
10 milieu une grande résistance lors du passage d'analytes.

La longueur et le nombre des segments à LCST présents dans les copolymères mis en oeuvre au sein des milieux selon l'invention, ainsi que leur nature chimique, peuvent par conséquent varier significativement dans le cadre de l'invention, et on peut ainsi faire varier grandement les propriétés
15 viscoélastiques des dits milieux selon l'application désirée, comme il sera montré plus précisément à l'exposé d'exemples de mise en oeuvre.

Les milieux selon l'invention sont donc propices à l'obtention de propriétés thermoépaississantes. Au sens de l'invention, on appelle "thermoépaississant" un milieu présentant soit un caractère thermoviscosifiant,
20 soit un caractère thermogélifiant.

Conformément à l'usage commun, on entend par thermoviscosifiant un milieu demeurant dans la ou les gammes de température d'utilisation capable d'écoulement dans un récipient macroscopique, en un temps compatible avec une manipulation aisée soit moins de 30 secondes environs. On entend au
25 contraire par "état de type gel" un milieu incapable d'écoulement significatif dans les mêmes conditions.

De façon équivalente, on appelle thermoviscosifiant, un milieu qui ne présente pas dans la ou les gammes de température d'utilisation d'hystérésis de leurs propriétés, ou de dépendance significative de ses propriétés en fonction
30 de la vitesse de changement de température, pour des vitesses de changement de température usuellement et commodément employées en électrophorèse capillaire, soit de l'ordre de 1 degré par minute à une dizaine de degrés par minute. On appellera par opposition "milieu thermogélifiant", ou de façon

équivalente "milieu donnant lieu à un état de type gel", un milieu présentant dans ces conditions une hystérésis de ses propriétés ou encore possédant une viscosité supérieure à 20 000 cp.

5 Selon une variante privilégiée, particulièrement adaptée au cas des méthodes automatisées dans lesquelles on veut minimiser le temps entre deux séparations consécutives, le milieu selon l'invention sera du type thermoviscosifiant.

10 Selon une autre variante, privilégiée quand un temps d'attente long entre séparations est acceptable, et quand on recherche une résistance maximale de la matrice au passage des analytes, on préférera au contraire un milieu selon l'invention donnant lieu à la température T2 à un état de type gel.

15 Selon un mode préféré de l'invention, tout ou partie ou une fraction significative des segments à LCST possèdent le long de leur squelette, un nombre moyen d'atomes supérieur à 75, ou présentent une masse moléculaire supérieure à 2500, et de préférence supérieure à 4500.

20 Au sens de l'invention, on entend par "une fraction significative", ou de façon abrégée par "tout ou partie", une proportion suffisante pour donner lieu par augmentation de température à une augmentation de viscosité d'au moins 100% ou de façon équivalente à la multiplication de la viscosité par un facteur 2.

25 Des copolymères optimisés pour la mise en œuvre de l'invention sont notamment ceux dans lesquels l'ensemble des segments à LCST représente entre 2 et 25 % en masse, de préférence entre 5 et 15 % en masse et de façon encore plus privilégiée entre 8 et 15% en masse de la masse molaire totale moyenne desdits copolymères, ou entre 3 et 20 % et de préférence entre 5 et 10 % de la composition totale des copolymères en nombre de moles de monomères.

30

Le milieu de séparation revendiqué peut avantageusement comprendre un ensemble de copolymères-bloc, comportant un squelette constitué par un segment ou une multiplicité de segments, de nature chimique

identique ou différente, et présentant le caractère commun d'être essentiellement solubles ou bien solvatés dans l'électrolyte aux températures T1 et T2, auquel sont liés de façon covalente une multiplicité de segments de nature chimique identique ou différente et présentant le caractère commun d'être essentiellement solubles ou bien solvatés dans l'électrolyte à la température T1, et essentiellement insolubles ou mal solvatés dans l'électrolyte à la température T2.

Toutes sortes de structures de copolymères de ce type peuvent être utilisées pour la mise en œuvre de l'invention, pourvu qu'elles présentent une multiplicité de segments à LCST non directement connectés, et donnent lieu à un thermoépaississement réversible dans les conditions de séparation.

A titre illustratif des différentes structures susceptibles d'être adoptées par le copolymère selon l'invention, on peut tout particulièrement citer celles où tout ou partie desdits copolymères se présentent :

- sous la forme d'un polymère linéaire séquencé,
- sous la forme d'un copolymère en peigne dont le squelette est constitué par un ou plusieurs segments solubles dans l'électrolyte aux températures T1 et T2 ou encore
- sous une forme ramifiée.

Dans la structure polymère linéaire séquencé, les segments à LCST sont présents en un nombre supérieur à 2 et sont séparés les uns des autres le long d'un squelette essentiellement linéaire par des segments de polymère ne présentant pas de LCST. La longueur de ces derniers segments peut être, dans le cadre de l'invention, ou relativement uniforme, ou au contraire variable, cette dernière variante étant préférée.

En fait, il est particulièrement intéressant de choisir un polymère bloc du type polymère en peigne, avec un squelette essentiellement soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2, porteur d'une multiplicité de chaînons latéraux essentiellement solubles dans l'électrolyte à la température T1 et insolubles dans l'électrolyte à la température T2. Selon un mode privilégié de mise en œuvre, les dits chaînons latéraux à LCST sont disposés le long du squelette de façon aléatoire ou non-régulière.

Ce mode de mise en oeuvre est en général préférable à la structure opposée, qui comporterait des polymères constitués d'un chaîne principale constituée de segments à LCST porteuse de greffons hydrophiles, dans la mesure où un polymère de ce deuxième type se contracte au dessus de la LCST et ne peut ainsi donner lieu au réseau continu d'obstacles topologiques nécessaire à la mise en oeuvre de l'invention.

Il est à noter que l'invention ne pourrait être mise en oeuvre avec des polymères blocs constitués de segments solubles dans l'électrolyte et de segments hydrophobes sans LCST, puisque de tels polymères donnent lieu à une thermofluidification.

Sont particulièrement intéressants dans le cadre de la présente invention des milieux de séparation dans lesquels l'une au moins des conditions suivantes est satisfaite:

- tout ou partie des copolymères possèdent un nombre moyen d'atomes, le long d'une section de segment soluble comprise entre deux points de liaison consécutifs dudit segment soluble avec des segments à LCST, supérieur à 210 ;

- tout ou partie des copolymères possèdent une masse moléculaire supérieure à 30 000 ou un nombre d'atome le long du squelette principal supérieur à 2000 et

- tout ou partie des copolymères possèdent une masse moléculaire comprise entre 50 000 et 3 000 000 ou un nombre d'atome le long du squelette principal compris entre 2500 et 100 000 et/ou

- Le nombre moyen de segments à LCST par chaîne est supérieur ou égal à 4, et de préférence compris entre 5 et 100.

Il est particulièrement intéressant pour la mise en oeuvre de l'invention d'utiliser des copolymères dont le ou les segments solubles aux températures T1 et T2 sont constitués d'au moins un polymère choisi parmi les polyéthers, polyesters comme l'acide polyglycolique, les homopolymères et copolymères statistiques solubles du type polyoxyalkylène comme le polyoxypropylène, polyoxybutylène, polyoxyéthylène, les polysaccharides, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, les polyuréthanes, les polyamides,

les polysulfonamides, les polysulfoxydes, le polystyrènesulfonate, les dérivés polyacrylamides et polyméthacrylamides substitués ou non solubles dans ledit électrolyte.

5 A titre représentatif des polyacrylamides et polyméthacrylamides, on peut tout particulièrement citer le polyacrylamide, l'acide polyacrylique, le poly N,N-diméthylacrylamide et le polyacryloylaminopropanol.

Bien entendu, d'autres polymères solubles dans l'électrolyte
10 peuvent être utilisés selon l'invention en tant que segments solubles, en fonction de l'application particulière et de la facilité à les introduire au sein d'un polymère bloc de structure souhaitée.

Il est plus généralement intéressant que les segments solubles aient une solvation élevée dans l'électrolyte aux deux températures T1 et T2.

15

De nombreux types de polymères peuvent être choisis pour constituer les segments non contigus à LCST au sein d'un copolymère bloc utilisable selon l'invention, en fonction de l'électrolyte envisagé, des températures T1 et T2 préférées pour la mise en œuvre et des analytes à
20 séparer. De nombreux polymères à LCST sont connus de l'homme de l'art, en particulier en milieu aqueux. Il est ainsi possible de se reporter à l'ouvrage " Polymer Handbook " Brandrup & Immergut, John Wiley, New York.

Selon une variante préférée de l'invention, tout ou partie des segments polymériques à LCST dérivent d'un ou plusieurs polymères choisis
25 parmi :

- les polyvinylalkyléther comme le polyvinylméthyléther,
- les hydroxyalkylcelluloses comme l'hydroxyéthylcellulose et la méthylcellulose,
- les homopolymères d'étheroxydes tels les polyoxyalkylènes
30 comme le polyoxypropylène et le polyoxybutylène,

- les copolymères statistiques et séquencés d'étheroxydes comme les copolymères de type polyoxyalkylène présentant une LCST tels les polyoxyéthylène/polyoxypropylène et polyoxyéthylène/polyoxybutylène,

- les homo- et co-polymères alkylènes tels butylène-propylène, éthylène-propylène et éthylène-butylène et

- les dérivés polyacryliques dérivant de l'homopolymérisation ou copolymérisation de monomères choisis parmi les acides acrylique et méthacrylique, les acrylates et méthacrylates d'alkyle comme les acrylates d'hydroxypropyle et d'hydroxyéthyle, les N-alkyl-acrylamides ou -méthacrylamides comme les N-éthylacrylamide, N-isopropylacrylamide, les N,N'- dialkyl -acrylamides ou -méthacrylamides, les aryl-acrylamides ou -méthacrylamides et les alkylaryl-acrylamides ou -méthacrylamides.

Plus préférentiellement, le copolymère mis en œuvre selon l'invention comprend au moins deux segments non contigus à propriété LCST dérivant de l'homo- ou co- polymérisation de monomères choisis parmi les acides acrylique et méthacrylique, les N-alkyl-acrylamides ou -méthacrylamides comme les N-éthylacrylamide, N-isopropylacrylamide, les aryl-acrylamides ou -méthacrylamides et les alkylaryl-acrylamides ou -méthacrylamides.

Ainsi, on pourra utiliser à titre d'exemple et de façon non exhaustive en tant que segments à LCST du N-isopropylacrylamide (NIPAM), du N-isopropylmethacrylamide, du N,N'-diethylacrylamide, ou des copolymères statistiques de ces monomères entre eux ou avec d'autres.

Conviennent tout particulièrement à l'invention les copolymères suivants :

- les copolymères du type copolymère en peigne dont le squelette est de type acrylamide, acide acrylique, acryloylaminoéthanol ou diméthylacrylamide et au niveau duquel sont greffés des segments latéraux de type poly(N-alkyl ou N,N dialkyl)acrylamide de préférence de type poly(N isopropylacrylamide), ou des segments latéraux du type polyoxypropylène ou copolymère polyoxyéthylène/oxypropylène, statistique ou séquencé, ou plus

généralement des segments latéraux de type polyéther notablement plus hydrophobes que le polyoxyéthylène

- les copolymères du type copolymère séquencé et présentant le long de leur squelette une alternance de segments de type polyoxyéthylène et de segments de type polyoxypropylène, ou une alternance de segments de type polyoxyéthylène et de segments de type polyoxybutylène ou plus généralement une alternance de segments de polyéthylène et de segments de type polyéther notablement plus hydrophobes que le polyoxyéthylène.

A titre d'exemples, on peut utiliser comme copolymères dans le milieu de séparation revendiqué les copolymères choisis parmi les polyacrylamide/poly(N-isopropylacrylamide) (PAM-NIPAM); polyvinylalcool/poly(N-isopropyl-acrylamide) (PVA-NIPAM), polyoxyéthylène/polyoxypropylène, polyacrylamide/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, polyacrylamide/polyoxypropylène, acide polyacrylique/polyoxypropylène, acide polyacrylique/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, acide polyacrylique/poly(N-isopropylacrylamide) et polydiméthylacrylamide/ poly(N-isopropyl- acrylamide) (PDMAM-NIPAM).

On peut avantageusement utiliser un milieu comprenant un copolymère peigne portant le long d'un squelette de polyacrylamide des segments à LCST essentiellement constitués de poly-NIPAM, et comportant le long de leur squelette un nombre d'atomes de carbone compris entre 35 et 600, et dont la fraction en masse totale n'excède pas 25 %.

Il est également à noter que dans la majorité des applications, et notamment pour séparer des analytes chargés, il est préférable d'utiliser un polymère selon l'invention essentiellement neutre. Il peut cependant être utile pour certaines applications, et notamment pour séparer des analytes faiblement ou pas chargés, ou tendant à s'associer au polymère, à choisir un polymère selon l'invention délibérément chargé. Des polymères de ce type pourront être commodément préparés par exemple en faisant figurer dans les segments solubles dans l'électrolyte aux températures T1 et T2 une portion notable d'acide acrylique polymérisé. Un copolymère de ce type est plus particulièrement décrit en exemple 10 ci-après.

En ce qui concerne plus particulièrement la concentration en copolymère dans le milieu, elle est généralement inférieure à 20 g/100ml en poids. Pour des applications de séquençage d'ADN, elle est de préférence comprise entre environ 1 et 8 g/100ml en poids.

5 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les copolymères utilisés dans ledit milieu sont avantageusement capables, dès une concentration de l'ordre de 5 g/100ml et de préférence de l'ordre de 2 g/100ml, en poids de faire transiter réversiblement ledit milieu d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100 % à
10 V1, obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20°C à T1.

Egalement, selon une variante préférée de l'invention, la viscosité V2, est supérieure d'au moins un facteur de 5 à la viscosité V1.

En ce qui concerne la préparation des copolymères mis en œuvre
15 selon l'invention, elle peut être effectuée par toute technique conventionnelle de polymérisation ou polycondensation. Le choix de la méthode de préparation est généralement effectué en prenant en compte la structure désirée pour le copolymère à savoir peigne, linéaire ou ramifié et la nature chimique des différents blocs le constituant.

20 A titre représentatif de ces variantes de préparation, on peut tout particulièrement citer les procédés selon lesquels lesdits copolymères sont obtenus par :

- polycondensation, polymérisation ou copolymérisation, ionique ou radicalaire, de monomères identiques ou différents, de macromonomères
25 identiques ou différents, ou d'un mélange de monomères et de macromonomères identiques ou différents ou

- par greffage de plusieurs segments polymériques à LCST sur un squelette polymérique linéaire ou ramifié essentiellement du type soluble, ou par polymérisation de segments latéraux polymériques à LCST à partir d'un
30 squelette polymérique linéaire ou ramifié essentiellement du type soluble.

De manière préférée, tout ou partie des copolymères mis en œuvre selon l'invention sont obtenus par :

- a) copolymérisation de monomères essentiellement du type soluble et de macromonomères essentiellement du type à LCST comportant à l'une au moins de leurs extrémités une fonction réactive, ou

- b) copolymérisation de macromonomères essentiellement de type à LCST comportant à l'une au moins de leurs extrémités une fonction réactive, et de macromonomères essentiellement de type soluble comportant au sein de leur structure au moins une fonction réactive.

Au sens de l'invention, on entend par fonction réactive un groupement permettant à la molécule porteuse de ce groupement d'être intégrée dans la macromolécule au cours de la réaction de copolymérisation sans interrompre ladite copolymérisation.

A l'aide des règles et modes privilégiés énoncés ci-dessus, l'homme de l'art est capable de préparer des copolymères conformes à l'invention, en adaptant la structure, la nature et le mode de préparation desdits polymères en fonction des propriétés de séparation recherchées pour une application ou une autre.

A titre représentatif mais non limitatif des milieux de séparation revendiqués, on peut tout particulièrement citer les milieux suivants :

- les milieux transitant d'une viscosité V_1 comprise entre 50 et 1000 $\text{mPa m}^{-1} \text{s}^{-1}$ à une température T_1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V_2 supérieure à V_1 d'un facteur compris entre 2 et 50 à une température T_2 de l'ordre de 40°C ou supérieure et comprenant entre 5 g/100ml et 20 g/100ml de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 30 000 et 2 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal est compris entre 1 000 et 60 000,

- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2 % et 20 %, et

- une masse moléculaire moyenne des segments à LCST comprise entre 2 000 et 20 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST compris entre 35 et 350 ;

- les milieux transitant d'une viscosité $V1$ comprise entre 100 et 10 000 mPa m⁻¹ s⁻¹ à une température $T1$ comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité $V2$ supérieure à $V1$ d'un facteur compris entre 2 et 100 à une température $T2$ supérieure à 40° C et comprenant entre 1g/100ml et 8g/100ml de copolymères possédant :

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 500 000 et 5 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 7000 et 90 000,

- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2,5 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne de segments à LCST comprise entre 4 000 et 30 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST compris entre 60 et 600 ; et

- les milieux transitant d'une viscosité $V1$ comprise entre 100 et 10 000 mPa m⁻¹ s⁻¹ à une température $T1$ comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité $V2$ supérieure à $V1$ d'un facteur compris entre 2 et 100 à une température $T2$ de l'ordre de 40°C ou supérieure et comprenant entre 0,1 g/100ml et 5 g/100ml de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne supérieure à 500 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 7 000,

- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne des segments à LCST supérieure à 4 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST supérieur à 90.

Dans la présente description, la viscosité est celle obtenue à un taux de cisaillement de 10s⁻¹.

On peut également, dans le cadre de l'invention, inclure dans le milieu de séparation, en plus du ou des copolymères à caractère thermoépaississant, d'autres espèces ne présentant pas ces propriétés, telles qu'en particulier des polymères hydrosolubles, des polymères associatifs non thermoépaississants, ou encore des agents de surface neutres ou ioniques, à la

condition que ces adjuvants ne donnent pas lieu à une démixion au sein du milieu de séparation ou à une perte du caractère thermoépaississant réversible. De tels adjuvants peuvent être intéressants pour moduler les propriétés et/ou le pouvoir séparateur dudit milieu. Il est en particulier connu que l'addition de certains surfactants peut dans certain cas renforcer l'association entre polymères, et donc le caractère thermoépaississant. Il peut également être intéressant d'ajouter au milieu des polymères associatifs ou non de faible masse moléculaire, pour améliorer la séparation des plus petits analytes contenus dans un mélange sans affecter gravement la viscosité globale, comme cela est connu dans des contextes différents de celui de l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un milieu de séparation tel que défini ci-dessus pour la séparation ou l'analyse d'espèces choisies parmi des espèces moléculaires ou macromoléculaires, et en particulier des macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les analogues d'acides nucléiques obtenus par synthèse ou modification chimique, les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides, des molécules organiques, des macromolécules synthétiques ou des particules telles que des particules minérales, de latex, des cellules ou des organelles.

Elle est particulièrement utile pour le séquençage de l'ADN, pour lequel elle permet d'obtenir des conditions de séparation optimales liées à une forte viscosité, à une température élevée pour laquelle la résolution des compressions est bonne et la séparation rapide, tout en conservant à la température ambiante une viscosité modérée permettant une injection aisée de l'ADN.

Cependant, la possibilité offerte par l'invention de faire varier grandement la viscosité du milieu en changeant de température est également avantageuse pour d'autres applications.

Elle est en particulier avantageuse chaque fois qu'une augmentation de la rigidité ou de la viscosité du milieu contenu dans un capillaire ou un microcanal serait souhaitable. Par exemple, une viscosité élevée permet

de réduire les effets électrohydrodynamiques responsables d'une mauvaise séparation des grands ADN en champ pulsé et plus généralement de réduire les écoulements hydrodynamiques nuisibles au sein d'un capillaire ou d'un microcanal.

Il est également à noter que, bien que les milieux selon l'invention exercent en général au mieux leur effet bénéfique à l'aide d'un changement de température, ils conviennent également à une utilisation à température constante. Ils peuvent ainsi se prêter à une introduction dans le canal de séparation et à la séparation consécutive des analytes à la même température. Ceci peut être intéressant, en particulier si on dispose d'un appareil capable d'introduire dans le canal de séparation un milieu de forte viscosité, et/ou ne permettant pas aisément de modifier la température entre l'introduction dudit milieu dans le canal et la séparation des analytes.

Un autre avantage des fortes viscosités autorisées par les milieux selon l'invention, est qu'elles réduisent l'électroosmose (voir par exemple Bello et coll., Electrophoresis 15, 623, 1994), sans qu'il soit besoin de recourir à d'autres modes de suppression de l'électroosmose connus de l'homme de l'art, tels que par exemple l'utilisation de polymères présentant une affinité pour la paroi du capillaire, ou encore le greffage de polymères hydrophiles neutres sur la surface. Si la suppression de l'électroosmose ou de l'interaction des analytes avec les parois effectuée par les milieux selon l'invention n'est pas suffisante pour une application particulière, on peut associer à l'invention un de ces procédés connus de l'homme de l'art, et obtenir ainsi des propriétés encore supérieures à celles obtenues avec ces méthodes utilisées seules.

Avantageusement, il est possible de moduler les propriétés séparatrices du milieu revendiqué via la sélection d'un copolymère conforme à l'invention et dont l'effet thermoépaississant est plus particulièrement optimisé pour la séparation d'espèces de tailles définies.

A titre illustratif de ce type d'adaptation accessible selon l'invention, on peut en particulier :

- séparer des molécules de masse moléculaire inférieure à 50 000 ou des oligonucléotides comprenant moins de 100 nucléotides, ou encore des protéines natives ou dénaturées avec un milieu transitant d'une viscosité V_1

comprise entre 50 et 1000 mPa m⁻¹ s⁻¹ à une température T1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 2 et 50 à une température T2 de l'ordre de 40°C ou supérieure et comprenant entre 5 g/100ml et 20 g/100ml de copolymères possédant :

5 - une masse moléculaire moyenne comprise entre 30 000 et 2000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal est compris entre 1 000 et 60 000,

 - une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2 % et 20 %, et

10 - une masse moléculaire moyenne des segments à LCST comprise entre 2 000 et 20 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST compris entre 35 et 350,

 - séparer des produits de réaction de séquence d'ADN, des ADN
15 duplex de moins de 1000 paires de bases, des protéines dénaturées ou des polymères synthétiques ou naturels de masse moléculaire comprise entre 20 000 et 10 000 000 avec un milieu transitant d'une viscosité V1 comprise entre 100 et 10 000 mPa m⁻¹ s⁻¹ à une température T1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 2 et 100 à une
20 température T2 supérieure à 40° C et comprenant entre 1g/100ml et 8g/100ml de copolymères possédant :

 - une masse moléculaire moyenne comprise entre 500 000 et 5 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 7000 et 60 000,

25 - une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2,5 % et 15 %, et

 - une masse moléculaire moyenne de segments à LCST comprise entre 4 000 et 30 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST compris entre 60 et 600 ou

30 - séparer des ADN duplex de taille comprise entre 500 bases et plusieurs millions de paires de bases, ou des particules telles que des latex, des cellules entières, des chromosomes entiers ou des organelles avec un milieu

transitant d'une viscosité $V1$ comprise entre 100 et 10 000 mPa $m^{-1} s^{-1}$ à une température $T1$ comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité $V2$ supérieure à $V1$ d'un facteur compris entre 2 et 100 à une température $T2$ de l'ordre de 40°C ou supérieure et comprenant entre 0,1 g/100ml et 5 g/100ml de copolymères possédant :

- une masse moléculaire moyenne supérieure à 500 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 7 000,
- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2 % et 15 %, et
- une masse moléculaire moyenne des segments à LCST supérieure à 4 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST supérieur à 90.

Plus préférentiellement, ces milieux comprennent un ensemble de copolymères choisi parmi :

- les copolymères du type copolymère en peigne dont le squelette est de type acrylamide, acryloylaminoéthanol ou diméthylacrylamide et au niveau duquel sont greffées des chaînes latérales de type poly(N isopropylacrylamide) et
- les copolymères du type copolymère séquencé et présentant le long de leur squelette une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxypropylène, ou une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxybutylène ou plus généralement une alternance de blocs de type polyoxyalkylène solubles et de blocs polyoxyalkylène à LCST.

A titre illustratif de mode d'utilisation du milieu de séparation revendiqué, on peut notamment proposer celui comprenant :

- la sélection d'un milieu de séparation selon l'invention, en fonction des caractéristiques des espèces à séparer ;
- l'introduction de ce milieu dans un canal de séparation d'appareil d'électrophorèse en une quantité suffisante pour en constituer le milieu de séparation ;

- la mise à la température T2 d'une portion significative du canal, soit préalablement soit consécutivement à l'introduction d'un échantillon ;
- l'introduction à l'entrée du canal de séparation d'une quantité d'échantillon ;
- 5 - la réalisation de la séparation à une température de l'ordre de T2 dans la partie du canal thermostatée ; et
- la détection de la migration des analytes initialement contenus dans l'échantillon.

Cette détection fait appel à des techniques conventionnelles qui relèvent des compétences de l'homme de l'art et ne seront donc pas détaillées dans la présente description.

Il est à noter que l'utilisation du milieu revendiqué, couvre également les variantes dans lesquelles la température est modifiée au cours de l'étape de séparation, dans la mesure où ladite variation de température comprend une température ou une gamme de températures T2 à laquelle s'effectue le thermoépaississement du milieu telle que défini précédemment, ainsi que les variantes dans lesquelles le cycle ci-dessus est répété un nombre quelconque de fois, préférentiellement de façon automatique.

En fait, l'invention est particulièrement avantageuse dans le cas de séparations électrocinétiques automatisées, puisqu'elle permet un remplissage automatique du canal de séparation de façon plus aisée et plus rapide. Par ailleurs, l'introduction de l'échantillon peut être, dans le cadre de l'invention, effectuée avant, pendant ou après le chauffage d'une portion significative du canal de séparation à la température T2.

La présente invention a également pour objet les dispositifs d'électrophorèse capillaire, dont ceux sur puces mettant en oeuvre à titre de milieu de séparation un milieu conforme à l'invention. Elle est particulièrement utile dans le cas des dispositifs d'électrophorèse dits "sur puce" ou en microcanaux gravés, puisque, d'une manière générale, ces dispositifs tolèrent plus difficilement l'application de pressions élevées pour l'introduction du milieu de séparation que les capillaires cylindriques.

Les milieux selon l'invention et les méthodes de séparation mettant en jeu ces milieux sont particulièrement avantageux pour les applications de

diagnostic, de génotypage, et de criblage à haut débit, de contrôle de qualité, ou pour la détection de présence d'organismes génétiquement modifiés dans un produit.

Les figures et exemples donnés ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

Figures

Figure 1 : Evolution de la viscosité en fonction de la température pour différents copolymères PAM-NIPAM, PDMA-NIPAM et pour un polyacrylamide conventionnel en solution à 5 g/100ml dans l'eau.

Figures 2 : Evolution de la viscosité en fonction de la température de copolymères selon l'invention

- le copolymère PAM-NIPAM T10, dans l'eau, dans un tampon 0,2M K_2CO_3 et un tampon 50 mM Tris-Taps, 7M urée utilisable pour le séquençage de l'ADN (figure 2a) et

- un copolymère PAM-NIPAM à deux concentrations différentes (2 et 3 g/100ml) (figure 2b).

Figures 3 : Exemple de séparation de fragments d'ADN duplex dans la gamme de taille 100-12000 paires de base ("kb ladder", Life Technologies, Paisley, UK) dans un milieu de séparation selon l'invention à base d'un polymère PAM-NIPAM (T15) en solution à 2 g/100ml dans un tampon TRIS-TAPS à 25° C (figure 3a) et 60°C (figure3b).

Figures 4 : Electrophorégrammes représentant la séparation de fragments de restriction "PhiX-174-RF DNA Hae III digest" (Pharmacia biotech) dans un milieu selon l'invention obtenu à base de polymère T7, à 20°C (figure 4a) et à 50°C (figure 4b).

Figures 5 : Exemple de séparation de fragments d'ADN duplex (100 bp fluorescein ruler, Bio-Rad) dans un milieu de séparation selon l'invention à base de T21 à deux températures 20° C (Figure 5a) et 60° C (Figure 5b).

Figures 6 : Portions d'électrophorégrammes représentant la séparation d'un produit de réaction de séquence obtenu avec un milieu selon l'invention à base d'un copolymère PAM-NIPAM (T10) à 5 g/100ml en tampon TRIS-TAPS 7M urée à 60° C (figure 6c), PAM-NIPAM (T10) à 3 g/100ml (figure 6b) et avec un milieu de séquençage commercial (POP6 Perkin-Elmer) (figure 6a).

Figures 7 : Portions d'électrophorégrammes représentant la séparation d'un produit de réaction de séquence obtenu avec un milieu selon l'invention à base d'un copolymère PAM-NIPAM (T10) à 5 g/100ml en tampon TRIS-TAPS 7M urée à 60° C (figure 7c), PAM-NIPAM (T10) à 3 g/100ml (figure 7b) et avec un milieu de séquençage commercial (POP6 Perkin-Elmer) (figure 7a).

Figure 8 : Electrophorégrammes représentant la séparation de grand ADN duplex "high Mw markers" (Life Technologies, Paisley, GB), par électrophorèse pulsée dans un milieu selon l'invention obtenu à base de polymère T10 à 60°C.

Figures 9 : Evolution de la viscosité en fonction de la température pour

- un copolymère PVA-NIPAM, comparativement à celle d'un polymère PVA et
- un copolymère POP-POE-POP au regard de celle d'un polymère POE à une concentration de 5 g/100ml.

Figures 10 : Exemple de séparation de fragments d'ADN duplex dans la gamme de taille 50-500 paires de base (sizer 50-500 bp, Pharmacia

biotech) dans un milieu de séparation selon l'invention à base de PVA-NIPAM à deux températures 20° C (Figure 10a) et 40° C (Figure 10b).

Figures 11 : Electrophorégrammes représentant la séparation du
sizer 50-500 bp, Pharmacia biotech, obtenus avec dans un milieu à base de
POE (Figure 11a), à base de POP-POE-POP à 25° C (Figure 11b) et à base de
POP-POE-POP à 45° C (Figure 11c).

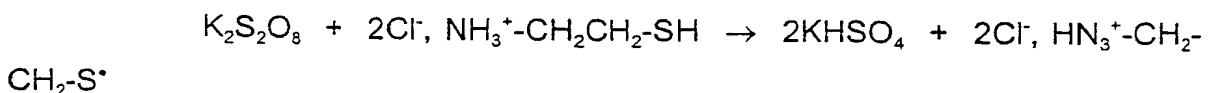
Figure 12 : Largeurs de bande pour une série de séparations de
fragments d'ADN simple brin en milieu dénaturant (fluorescein 50 bp ladder,
Pharmacia Biotech), dans des milieux selon l'invention se différenciant par le
nombre moyen et la longueur moyenne des segments à LCST : des largeurs de
bande plus petites correspondent à une meilleure séparation.

EXEMPLE 1 :

Préparation d'un macromonomère à LCST de pNIPAM non-
fonctionnalisé de masse moléculaire voisine de 10 000 en vue de la préparation
de copolymère thermogélifiant conformes à l'invention.

1) Polymérisation du NIPAM

La polymérisation radicalaire du NIPAM est réalisée dans l'eau
pure, à une température légèrement supérieure à l'ambiante mais inférieure à la
L.C.S.T. du polymère. L'amorceur est un couple redox dont l'oxydant est le
persulfate de potassium, $K_2S_2O_8$ (KPS) et le réducteur est l'aminoéthanethiol
AET, HCl. La réaction d'amorçage est :



L'AET,HCl joue également le rôle d'agent de transfert, ce qui
permet de contrôler la longueur des chaînes.

Mode opératoire

Dans un tricol de 500 ml surmonté d'un réfrigérant et équipé d'un
dispositif d'arrivée d'azote, on introduit 20 g de NIPAM (0,18 mole) et 200 ml

d'eau. le mélange est alors agité et chauffé à 29° C par un bain d'eau. On démarre le barbotage d'azote. Au bout de 45 minutes, on ajoute 0,42 g d'AET,HCl (0,0037 mole) préalablement dissous dans 20 ml d'eau, puis 0,0018 moles de persulfate de potassium (KPS) dissous dans une quantité minimale d'eau. Le mélange est maintenu sous agitation durant 3 heures. La solution est ensuite concentrée puis lyophilisée.

Pour isoler le polymère on réalise une précipitation selon la procédure suivante :

Le solide obtenu est redissous dans 100 ml de méthanol. le chlorhydrate présent est neutralisé par addition de 0,0037 mole de KOH (soit 0,208 g -dissous dans environ 25 ml de méthanol) incorporés goutte à goutte dans la solution. Le sel formé, KCl, précipite et est extrait par filtration. Le filtrat ainsi récupéré est concentré puis versé goutte à goutte dans 4 litres d'éther. Le polymère précipite et est récupéré par filtration sur fritté n° 4. Le solide est ensuite séché sous vide de pompe à palettes. Le rendement massique est de l'ordre de 50 %.

Le protocole ci-dessus conduit à un polymère aminé " PNIPAM-A-10 ", et correspond à des rapports amorceur-monomère $R_o=0,02$ et $A_o=0,01$, où:

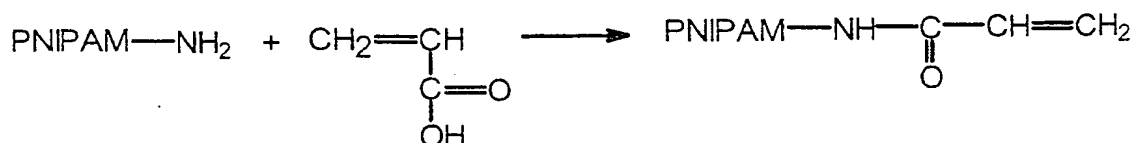
$$R_o = [R-SH] / [NIPAM] \text{ et } A_o = [KPS] / [NIPAM].$$

Différents autres polymères aminés ont été préparés selon le même protocole en variant la température de polymérisation et le rapport R_o , tout en conservant un rapport A_o de 0,01. Ces polymères sont décrits et définis dans le tableau 1.

2) Modification du PNIPAM aminé en vue de sa copolymérisation avec un ou plusieurs segments solubles aux températures T1 et T2.

Les macromolécules de PNIPAM synthétisées présentent des fonctions amines en bout de chaînes, celles-ci provenant de l'amorceur aminoéthanethiol AET,HCl.

Par réaction de la fonction amine sur l'acide acrylique, on fixe une double liaison vinylique à l'extrémité de la chaîne selon le schéma réactionnel suivant :



5

Mode opératoire :

Dans un bécher de 100 ml, on introduit 50 ml de chlorure de méthylène, 1,5 g d'acide acrylique (0,021 mole), 9 g de PNIPAM et 4,3 g de dicyclohexylcarbodiimide (DCCP) (0,21 mole).

10

Le milieu réactionnel est agité pendant une heure. L'acide acrylique étant en fort excès par rapport au PNIPAM (la quantité d'acide acrylique est environ vingt fois celle du PNIPAM), on peut supposer que toutes les fonctions aminées ont été modifiées, ce qui sera confirmé par les copolymérisations décrites dans l'exemple 2. Le mélange est ensuite filtré sur fritté n° 4 pour éliminer le précipité dicyclohexylurée, sous-produit résultant de la transformation du DCCl.

15

Le mélange est ensuite concentré jusqu'à 15 ml puis versé goutte à goutte dans 200 ml d'éther pour précipiter le polymère. On filtre sur fritté n° 4 et on lave le solide avec trois fois 100 ml d'éther puis on le sèche sous vide de la pompe à palettes pendant une nuit.

20

On obtient ainsi un macromonomère poly-(NIPAM) porteur d'une fonction allyl en bout de chaîne, avec un rendement massique de l'ordre de 70 %.

25

Les masses molaires des macromonomères ainsi préparés ont été mesurées par SEC (chromatographie d'exclusion stérique) dans les conditions suivantes :

a : en solution aqueuse de LiNO_3 0,5 M à 20°C en utilisant 4 colonnes Shodex OH Pack B803 à B806 de 25 cm en série, avec détection réfractométrique et étalonnage de masses moléculaires relatif à un standard POE

5 b : dans le THF à 40°C, avec colonne ultrastyrigel, double détection réfractométrique et étalonnage universel par rapport à des échantillons de polystyrène. Ce deuxième mode de détermination est plus sûr ; car d'une part l'étalonnage universel s'affranchit de la différence de flexibilité entre les chaînes du polymère à étudier et des étalons, et d'autre part parce que le THF est un
10 meilleur solvant du PNIPAM que l'eau.

TABLEAU 1

Masse moléculaire	PNIPAM-C	PNIPAM-5	PNIPAM-M	PNIPAM-10	PNIPAM-L	PNIPAM-20
conditions de préparation	Ro=0,03 23°C	Ro=0,025 23°C	Ro=0,02 25°C	Ro=0,02 29°C	Ro=0,015 25°C	Ro=0,01 25°C
Mw (g/mol) (b)	10800	12800	15800	20400	23000	34000
Nombre moyen d'atomes le long de la chaîne (b)	200	230	290	370	420	620
polymolécularité (Mw/Mn)(b)	5,7	2,0	4,2	3,2	4,9	5
Mw (g/mol) (a)		4500				21000
polymolécularité (Mw/Mn)(a)		1,6				4,6

Ces résultats montrent qu'il est possible de faire varier la masse moléculaire moyenne des macromonomères en variant la température de polymérisation, et le rapport amorceur/polymère R_o , les rapports R_o les plus élevés conduisant aux masses moléculaires les plus faibles. Ils montrent également que les polymolécularités des macromonomères sont élevées, en général supérieures à 2.

EXEMPLE 2 :

Préparation de différents copolymères à structure peigne et comprenant à titre de segments à LCST les PNIPAMs préparés en exemple 1.

Cet exemple a pour objet la préparation de copolymères selon l'invention par copolymérisation de macromonomère(s) PNIPAM obtenu(s) selon l'exemple 1 avec des monomères du type hydrosoluble.

a) Synthèse

Cette copolymérisation est réalisée dans l'eau à température ambiante. L'amorceur utilisé est le couple redox persulfate d'ammonium $((NH_4)_2S_2O_8)$ [20 g/l] - métabisulfite de sodium $(Na_2S_2O_5)$. L'ensemble des copolymères ainsi préparé est purifié par précipitation dans l'acétone, à l'exception du copolymère T7 dont les segments solubles sont constitués de diméthylacrylamide DMAM, qui est purifié par ultrafiltration et lyophilisation.

Les différents polymères synthétisés sont répertoriés dans le tableau 2 ci-après, qui rend également compte des quantités de réactif utilisées (indiquées entre parenthèse).

Dans le tableau :

- Les viscosités sont exprimées en centipoises [A EXPRIMER EN SI], pour un polymère en solution à 5g/100ml dans l'eau et à un taux de cisaillement de $10s^{-1}$, à l'aide d'un viscosimètre cône-plan à taux de cisaillement uniforme Brookfield LDV III ;

- Elles ont été mesurées en solution aqueuse de $LiNO_3$ 0,5 M à 20°C en utilisant 4 colonnes Shodex OH Pack B803 à B806 de 25 cm en série,

avec détection réfractométrique. Elles sont exprimées en 10^6 g/mole. Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs en "équivalent POE" (obtenues par comparaison avec des standards de polyoxyéthylène), avec détection réfractométrique.

5 Le copolymère T10 ainsi que d'autres copolymères de la même famille non décrits ici ont également été analysés en masse moléculaire à l'aide d'une détection par diffusion de lumière laser multiangle ("MiniDawn Wyatt), qui permet d'obtenir la masse moléculaire absolue. Par comparaison avec les masses en "équivalent POE" des mêmes polymères, on a évalué que pour
10 l'ensemble des polymères présentés dans le tableau 2, la masse moléculaire absolue est de l'ordre de deux fois la masse en équivalent POE : cette valeur estimée est donnée en caractères gras dans le tableau.

Connaissant la masse moléculaire moyenne des copolymères, celle des segments à LCST ou macromonomères, et la fraction en masse de
15 segments à LCST incorporée dans le copolymère, on déduit aisément le nombre moyens de segment à LCST par polymère (moyennes en masse), notés N_s dans le tableau 2, grâce à la formule:

$$N_s = f M_w(\text{copolymère}) / M_w(\text{macromonomère})$$

- Les valeurs en gras représentent la fraction f de segments à LCST
20 dans le copolymère final (fraction en masse).

Tous les copolymères décrits dans le tableau 2 présentent un caractère thermoviscosifiant.

TABLEAU 2

Copolymère	Monomère	Macromonomère	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Température de préparation	viscosité à 25°C	viscosité à 60°C	Mw	Mw/Mn	Ns
T7	DMAM (2,8 g)	PNIPAM-10 (0,7 g)	5 g/l	29° C	500	8000	ND	ND	ND
T10	AM (2,8 g)	PNIPAM-10 (0,4 g) 0,065	5 g/l	29° C	1000	11000	(1,48) 3	4	10
T10AA	AM (2,8 g)	(0) 0	5 g/l	29° C	800	700	(0,93) 2	2,4	0
T11	AM (2,8 g)	PNIPAM-10 (0,8 g) 0,12	20 g/l	23° C	100	1000	(0,38) 0,75	3,6	4
T12	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,8 g) 0,12	20 g/l	23° C	30	2000	(0,37) 0,75	4,8	7
T13	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,8 g) 0,12	10 g/l	23° C	100	10000	ND	ND	ND
T15	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,4 g) 0,065	5 g/l	25° C	200	13000	ND	ND	ND
T16	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,4 g) 0,065	5 g/l	29° C	800	15000	(1,1) 2,2	2,2	11
T21	AM (2,8 g)	PNIPAM-20 (0,8 g) 0,12	20 g/l	23° C	30	1800	ND	ND	ND
T22	AM (2,8 g)	PNIPAM-20 (0,4 g) 0,065	5 g/l	23° C	ND	ND	(1,0) 2	5	4
T24	AM (2,8 g)	PNIPAM-M (0,4 g) 0,065	5 g/l	29° C	ND	ND	(1,4) 3	6,6	12
T25	AM (2,8 g)	PNIPAM-C (0,4 g) 0,065	5 g/l	29° C	ND	ND	(1,1) 2,2	4,9	13
T26	AM (2,8 g)	PNIPAM-L (0,4 g) 0,065	5 g/l	24° C	ND	ND	(1,5) 3	4,7	8

Le mode opératoire présenté ci-après est donné pour la préparation du copolymère T7. Les modes opératoires pour les autres copolymères peuvent en être déduits en modifiant la nature et la concentration des réactifs, et éventuellement la température de réaction conformément au tableau 2.

5

Dans un ballon de 100 ml sont introduits le PNIPAM-10 et le monomère considéré ainsi que 30 ml d'eau distillée. Ce mélange est agité deux heures à température ambiante sous barbotage d'azote afin d'éliminer le dioxygène dissous.

10

On porte alors le mélange à la température choisie pour la polymérisation à l'aide d'un bain thermostaté, ajoute alors les amorceurs sous forme d'une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$ à 20 g/l et d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ à 5 g/L, soit respectivement 0,1 % et 0,03 % en mole de la quantité de monomères introduits. Le mélange est maintenu sous agitation et barbotage durant 4 heures.

15

Avant l'introduction des amorceurs, puis toutes les heures durant la polymérisation, on effectue des prélèvements du milieu réactionnel (0,1 ml dilués dans 5 ml de méthanol) afin de suivre l'évolution de la réaction par chromatographie d'exclusion stérique.

20

Généralement, les données associées à l'observation visuelle de l'augmentation de la viscosité du milieu réactionnel permettent de conclure au bon déroulement de la réaction, avec un rendement pratiquement total.

b) Purification

La purification des polymères se fait différemment selon la nature du squelette.

25

Pour les polymères dont le squelette est constitué de DMAM, il a été utilisé l'ultrafiltration selon le mode opératoire suivant :

Le milieu réactionnel est dilué dans un litre d'eau puis ultrafiltré sur une membrane dont le seuil de coupure est 100.000 Daltons. La solution de polymère est ensuite concentrée puis lyophilisée.

30

Le rendement est assez variable, généralement autour de 60 %.

Les macromolécules à squelette acrylamide sont précipitées dans l'acétone selon la procédure suivante :

Le milieu réactionnel est précipité lentement dans 1 litre d'acétone puis filtré sur fritté n° 4 et lavé avec trois fois 100 ml d'acétone. Le solide est récupéré puis séché une nuit à la pompe à palettes.

Le rendement massique est bien meilleur que pour l'ultrafiltration-
5 lyophilisation et est proche de 90 %.

Le taux d'incorporation des macromonomères a été vérifié par RMN de l'hydrogène sur les polymères dilués à 2g/100ml dans l'eau lourde (appareils Bruker à 250 et 400 MHz). On trouve que le taux d'incorporation ne dépend, aux fluctuations expérimentales près, que du rapport entre la masse initiale de
10 PNIPAM et la masse initiale de monomère hydrophile. Il est, respectivement, de 6,5+/-0,3 % en moles, pour une concentration initiale de 0,4g de PNIPAM pour 2,8g d'acrylamide, et de 12+/-1 % en moles, pour une concentration initiale de 0,8g de PNIPAM pour 2,8 g d'acrylamide.

15 EXEMPLE 3 :

Evaluation du comportement rhéologique de copolymères DMAM/PNIPAM et AM/PNIPAM préparés selon l'exemple 2 en fonction de la température.

20 Dans cet exemple, chacun des copolymères a été introduit à raison de 5g/100ml dans l'eau purifiée (MilliQ). La viscosité de chacune des solutions correspondantes a été mesurée sur un rhéomètre cone-plan Brookfield DV3 piloté par le logiciel Rheocalc (Sodexim, Muizon, F). Le taux de cisaillement retenu est de 10 (1/s) pour un gradient de température de 1°C par minute. Les
25 résultats obtenus sont représentés en figure 1.

On peut constater que les différents copolymères synthétisés présentent bien les propriétés rhéologiques qui permettent de les utiliser selon l'invention, et en particulier, qu'ils présentent une viscosité V_2 à une température T_2 significativement supérieure, d'un facteur supérieur à 2 (100 %), souvent
30 d'ordre 10, et pouvant aller jusqu'à un facteur 60, à la viscosité V_1 obtenue à une température T_1 inférieure à T_2 d'au moins 20°.

Pour les polymères décrits dans cet exemple, la température T1 peut être comprise entre 20 et 40°C, ou même inférieure, et la température T2 peut être supérieure à 45°, et préférentiellement de l'ordre de 60°C.

On constate également que le polymère T10AA, préparé à titre de
5 témoin selon le même protocole mais sans macromonomère PNIPAM, et ne pouvant donc présenter dans sa structure la multiplicité de blocs à LCST qui caractérise les copolymères selon l'invention, présente une viscosité qui décroît de façon faible et continue en fonction de la température, et ne peut donc exercer les effets bénéfiques de l'invention.

10 Par ailleurs, pour l'ensemble des copolymères et à une vitesse de changement de température de 1°C par mn, on n'observe pas d'hystérésis significative, la courbe de viscosité étant essentiellement identique en montée et en descente de température.

En comparant la figure 1 et le tableau 2, on note que la viscosité à
15 basse température est fortement corrélée à la masse moléculaire du copolymère. On remarque également que le comportement thermoviscosifiant et l'augmentation de viscosité avec la température sont fortement corrélés au nombre moyen de segments à LCST par chaîne Ns, les valeurs les plus élevées de ce paramètre correspondant aux effets thermoviscosifiants les plus forts

20 La figure 2a illustre le comportement rhéologique du copolymère T10 au sein d'un électrolyte ionique tel que par exemple le carbonate de potassium, ou encore un tampon de type TRIS-TAPS 50 mM/Urée 7M tel qu'on en utilise pour le séquençage.

En figure 2b sont représentés les comportements de deux solutions
25 à base du copolymère PAM-NIPAM T10, l'une pour une concentration de 3 g/100ml en copolymère et l'autre pour une concentration de 2 g/100ml en copolymère. On note que le caractère thermoépaississant est sensible dès 2 g/100ml, mais renforcé à 3 g/100ml et plus encore à 5 g/100ml (figure 1), la concentration étant également un paramètre qu'on fera utilement varier pour
30 adapter les milieux selon l'invention selon les applications particulières.

En particulier, la plupart des polymères présentés dans le tableau 2 présentent pour des concentrations inférieures ou égales à 5g/100ml un caractère thermoviscosifiant, c'est à dire qu'ils ne présentent pas d'hystérésis

significatif de leur viscosité en montée et descente de température, et sont capables d'écoulement en moins de 30 s quand on retourne le récipient.

Le polymère T16, par contre, donne lieu à un état de type gel à 60°C pour des concentrations de 8g/100ml et plus.

EXEMPLES 4 :

Propriétés de séparation de milieux de séparation pour électrophorèse capillaire comprenant à titre de copolymère, l'un des copolymères préparé selon l'exemple 2.

Les expériences d'électrophorèse présentées dans cet exemple et les suivants ont été effectuées à l'aide un appareil construit au laboratoire, similaire à celui décrit dans Lindberg et coll., Electrophoresis, 18, 1973 (1997). Les ADN séparés sont détectés par fluorescence avec excitation par un laser Argon à 488 nm et émission à 530+/-30 nm. L'injection est du type électrocinétique. Le capillaire, en silice fondue recouverte de polyimide (polymicro), de diamètre intérieur 100 µm, est thermostaté entre le point d'injection et le point de détection par circulation d'huile silicone dans une enveloppe étanche, à l'exception des 2 premiers et des 2 derniers centimètres. (sauf mention contraire, ce type de capillaire sera utilisé dans les expériences d'électrophorèse présentées ci-dessous)

Essai 4-1

Propriétés séparatrices d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PAM-NIPAM (T15) à une concentration de 2 g/100ml

Le milieu est mélangé au tampon TRIS-TAPS (50 mM) et au marqueur ADN (pour le SYBR GREEN I 10^{-4}).

Dans ce cas particulier, le remplissage du capillaire est effectué à 25°C, l'injection est réalisée en 10 secondes à 25 volts par centimètre et l'échantillon à séparer est de même nature que celui de l'essai précédent.

Les propriétés séparatrices dudit milieu sont évaluées à deux températures 25°C et 60°C et les figures 3a et 3b rendent compte de ces propriétés. On constate que la séparation est à la fois plus résolutive et plus rapide à 60°C.

5

Essai 4-2

Propriétés séparatrices d'un milieu de séparation à base du copolymère PAM-NIPAM (T12).

Le milieu est introduit dans le capillaire à 25°C à une concentration de 8 g/100ml mélangé au tampon TRIS TAPS (50 mM) et au marqueur d'ADN SYBR GREEN I (Molecular probes) dilué à raison de 10^{-4} par rapport à la solution stock vendue par le fournisseur. On note un comportement similaire avec une amélioration de la résolution et du temps de séparation, quand la température choisie pour la séparation est 60°C.

15

On constate également que la résolution pour de grands fragments d'ADN duplex est meilleure avec le copolymère T15, préparé avec faible taux d'agent de transfert et présentant donc une haute masse moléculaire, qu'avec le copolymère T12 préparé avec un taux d'agent de transfert plus élevé et présentant une masse moléculaire plus faible.

20

Essai 4-3

Propriétés séparatrices d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PDMAM-NIPAM (T7) à une concentration de 2 g/100ml.

25

Ce milieu est mélangé au tampon TRIS-acétate (50 mM) et au marqueur ADN SYBR GREEN I 10^{-4} .

Dans ce cas particulier, l'échantillon est le marqueur " Phi-X 174-RF DNA, Hae III digest " (Pharmacia biotech), dont les fragments ont des tailles comprises entre 72 et 1358 bp, l'injection est réalisée en 5 secondes à 20 volts par centimètre et l'échantillon à séparer est de même nature que celui de l'essai précédent.

30

Les propriétés séparatrices dudit milieu sont évaluées à deux températures 25°C et 50°C et les figures 4a et 4b rendent compte de ces

propriétés. On constate, comme dans l'essai précédent, que la séparation est à la fois plus résolutive et plus rapide à plus haute température.

Essai 4-4

Propriétés séparatrices d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PAM-NIPAM T21, préparé à partir du macromonomère PNIPAM-20, à une concentration de 2 g/100ml.

Le milieu est mélangé au tampon TRIS-acétate (50 mM). Pour ce milieu de séparation, la viscosité à haute température est relativement peu élevée, et ne permet pas une suppression totale de l'électroosmose. En conséquence, le capillaire a été préalablement à sa mise en œuvre, lavé avec une solution d'acide chlorhydrique 1M comprenant 1 g/100ml de polyvinylpyrrolidone de masse moléculaire 1 000 000 (Polysciences, Eppelheim, D).

Dans ce cas particulier, l'échantillon est le marqueur " 100 bp fluorescein ladder ", Bio-Rad, dont les fragments présentent des tailles comprises entre 100 et 1000 bp, l'injection est réalisée en 10 secondes à 25 volts par centimètre.

Les propriétés séparatrices dudit milieu, introduit dans le capillaire à 25°C, sont évaluées à deux températures 25°C et 50°C et les figures 5a et 5b rendent compte de ces propriétés.

On constate, comme dans l'essai précédent, que la séparation est plus rapide à plus haute température, mais que le gain en résolution est moins important qu'avec par exemple T15 ou T7, qui présentent un caractère thermoépaississant plus marqué. Ceci confirme que le caractère thermoépaississant, tel qu'il apparaît dans les courbes de viscosité en fonction de la température, est un avantage caractéristique des milieux selon l'invention, et que les dites courbes de viscosité peuvent être utilisées comme guide pour l'optimisation des propriétés de séparation.

Essai 4-5

Séparation des produits de séquence à l'aide d'un milieu de séparation comprenant le copolymère PAM-NIPAM (T10).

Le copolymère est utilisé à deux concentrations différentes, 3 g/100ml et 5 g/100ml, respectivement, en tampon TRIS TAPS (50 mM), urée 7M. Le pH du milieu est de l'ordre de 8,2. A titre de témoin, il est réalisé un essai avec un milieu de séquençage commercial (POP6 Perkin-Elmer), utilisé tel que
5 reçu.

Le capillaire utilisé possède une longueur de 40 cm avec une longueur efficace de 30 cm et un diamètre interne de 100 µm. Pour les milieux de séparation à base de polymère T10, qui ne présentent pas de propriétés spécifiques d'adsorption sur la silice, le capillaire est préalablement à sa mise en
10 œuvre, lavé avec une solution d'acide chlorhydrique 1M et comprenant 1 g/100ml de polyvinylpyrrolidone de masse moléculaire 1 000 000. Le milieu de séparation est introduit dans le capillaire à 25°C.

L'échantillon testé est le produit d'une réaction de séquence d'ADN ssM13mp18, (fragments à terminaison " T "), préparé par séquençage cyclique
15 (" cycle sequencing ") avec le kit fluorescein-primer distribué par Amersham, selon les indications fournies par le fabricant.

Le champ électrique est de 200 volts par centimètre et l'injection est réalisée en 8 secondes à 200 volts par centimètre. Les capacités séparatrices de chacun de ces milieux sont évaluées à la température de 60°C. Les figures 6 et 7
20 rendent compte respectivement des capacités séparatrices du milieu de séquençage commercial (témoin figure a), et des milieux selon l'invention à base du copolymère T10 à des concentrations respectives de 3 g/100ml (figures b) et 5 g/100ml (figures c) (les numéros au dessus des pics représentent la longueur du fragment d'ADN moins 48 bases)

25

Essai 4-6

Propriétés séparatrices vis à vis de fragments de séquences à l'aide de différents milieux de séparation conformes à l'invention.

Les milieux testés sont à base soit du copolymère PAM-NIPAM
30 (T12) à une concentration de 8 g/100ml, du copolymère PAM-NIPAM (T13) avec une concentration de 5 g/100ml ou du copolymère DMAM-NIPAM (T7) avec une concentration à 5 g/100ml, respectivement.

Chacun de ces milieux est bien entendu complété en tampon TRIS TAPS (50 mM) et en urée 7M. Ils possèdent un pH de 8,2, la nature de l'échantillon et les conditions de séparation sont les mêmes que celles retenues dans le cadre de l'essai précédent.

Ces différents essais confirment que plusieurs milieux selon l'invention, présentant une viscosité à la température ambiante relativement modérée, de l'ordre de $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ou même nettement inférieure, permettent de séparer des fragments de séquence d'ADN avec des performances égales ou supérieures aux milieux du commerce. On remarquera en particulier que la résolution obtenue avec le T10 à 5g/100ml est nettement supérieure à celle obtenue avec le POP6, en un temps légèrement inférieur.

Essai 4-7

Séparation à l'aide de fragments d'ADN d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PAM-NIPAM (T10).

Le copolymère utilisé à une concentration de 2 g/100ml est mélangé au tampon TRIS-TAPS (50 mM), EDTA 2 mM et au marqueur ADN SYBR GREEN I 10^{-4} . La longueur du capillaire est de 15 cm, dont 10 cm jusqu'au détecteur, et le capillaire est du type " DB17 " (JW scientific) de diamètre intérieur 100 micromètres, afin de supprimer l'électroosmose résiduelle apparaissant avec ce milieu.

Dans ce cas particulier, l'échantillon est le marqueur High molecular weight standard (Life Technologies), et présente des fragments compris entre 8271 et 48502 paires de bases. l'injection est réalisée en 5 secondes à 100 volts par centimètre. La séparation s'effectue en champs pulsés avec des impulsions carrées de +/- 200V, une asymétrie entre les impulsions + et - de 20 % et une fréquence de 30 Hz. La séparation des fragments peut être effectuée en moins de 20 mn (Figure 8), contre plusieurs heures dans une solution de polymères enchevêtrée ordinaire (Heller et coll. Electrophoresis, 16, 1423-1428 (1995).

Essai 4-8

Propriétés de séparation et résolution à 40 °C de milieux de séparation conformes à l'invention.

Les milieux testés contiennent des polymères basés sur des macromonomères NIPAM de longueur différente (T22, T26, T24 et T25, respectivement), dissous à 3 g/100ml en tampon TRIS TAPS (50 mM), urée 7M. Le pH du milieu est de l'ordre de 8,2. l'échantillon utilisé est un "50 BP LADDER-fluorescein Pharmacia.

Les résultats en termes de largeur de pic sont donnés dans la figure 12.

Il en ressort que la meilleure résolution (plus faible largeur de pic), est pour cette série obtenue avec le polymère T24 (préparé à partir de macromonomères de masse moléculaire moyenne 15000), et que les milieux à base de T25 et T26 donnent également des résultats très satisfaisants et suffisants pour effectuer un séquençage de bonne qualité.

Essai 4-9

Séparation de produits de réaction de séquence à l'aide d'un milieu de séparation selon l'invention à température constante.

Le milieu testé est du type T16, à 5g/100ml, en tampon Na TAPS 50 mM, EDTA 2 mM, urée 7M, le dit milieu étant introduit dans le capillaire à 50°C, et la séparation s'effectuant également à 50°C. On utilise un appareil ABI 310.

On note que la lecture s'effectue très bien jusqu'à plus de 500 bases, et que l'introduction à basse température n'est pas dans ce cas précis indispensable à la mise en oeuvre du milieu selon l'invention. Cette propriété avantageuse provient du fait que le milieu est du type thermoviscosifiant, et ne présente donc pas à la température à laquelle s'effectue la séparation, un état de type gel qui empêcherait son introduction dans le capillaire.

EXEMPLE 5 :

Préparation de copolymères PVA-NIPAM (PolyVinylAlcool/Poly-N-Isopropylacrylamide).

L'alcool polyvinylique constituant le squelette hydrosoluble du copolymère est obtenu au préalable par hydrolyse de l'acétate de polyvinyle. Le

polymère utilisé pour l'étude possède un taux d'acétate de 12,4 % en mole et une masse molaire en poids de 145 000 g/mole. Sa viscosité intrinsèque dans l'eau à 30° C est de 92 ml/g, la concentration critique de recouvrement des chaînes C* est d'environ 1,25 g/100ml.

5 La voie de synthèse suivie est du type "grafting from". Elle est décrite par Nonaka & al. en milieu homogène (Y. Nonaka, Y. Ogata, S. Kurihara, Journal of Applied Polymer Science, vol. 52, 951-957 (1994)) ou Ikada & al. dans le cas d'un squelette de polymétacrylate de méthyle (Y. Ikada, Y. Nischizaki, I. Sakwada, J. Polym. Sci., Vol. 12, 1829-1839 (1974)).

10 La synthèse est réalisée à 60° C pendant 20 heures dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), en présence de persulfate de potassium (KPS) afin de générer des radicaux sur les squelettes PVA. Ces radicaux induisent alors la polymérisation du monomère présent dans le milieu pour conduire au produit final.

15 La formation de groupements carbonyle selon une réaction secondaire de tautomérie céto-énolique provoque l'apparition d'une coloration jaune effectivement observée durant le synthèse.

Le tableau 3 ci-après rend compte des caractéristiques du PVA-NIPAM obtenues selon ce protocole.

TABLEAU 3

	m (g) ou V (ml)
PVA	5g
NIPAM	5g
KPS	0,08g
DMSO	100ml
KPS/PVA ratio molaire	0,26
homoNIPAM m (g) Mw ^b (g/mol)	0,772 19.300
Copolymère m (g) rendement (%)	8,9 89
Taux de greffage ^c % poids NIPAM	32,3

^b déterminée par SEC dans le THF à 40°C, avec colonne ustrastyrigel
5 (chromatographe Waters 150 CV+), détection réfractométrique et étalonnage
simple par rapport à des standards de polystyrène.

^c déterminée par RMN.

EXEMPLE 6 :

10 Préparation d'un copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP

Ce copolymère est préparé selon un protocole dérivé de celui décrit
par J.P. Kaczmariski et J.E. Glass, Langmuir, 1994, 10, 3035-3042.

15 Environ 10 g de polyéthylèneglycol de poids moléculaire 35.000
(Merck, Hohenbrunn, D) (PEG) et 100 ml de toluène anhydre sont mélangés
sous atmosphère d'argon (les polyoxyéthylènes de basse masse moléculaire
sont couramment appelés " polyéthylène glycol "). Une fois que le PEG est
dissous dans le toluène, le mélange est chauffé à reflux sous argon et

approximativement 10 à 15 ml de toluène anhydre sont évaporés. La solution est refroidie à température ambiante et 120 mg (0,2 % en poids) de dilaurate de dibutylétain sont ajoutés à la solution. Une quantité stoechiométrique de diisocyanate isophorone (128 mg) est dissoute dans 5 ml de toluène anhydre et ajoutée au mélange. La réaction est suivie par visualisation spectroscopie infrarouge (par valorisation de la diminution de la bande isocyanate à 2260 cm^{-1}). Au terme de 90 minutes, 2,4 g de polypropylèneglycol monobutyl éther (Mn 400) (PPG) (Aldrich, Milwaukee, USA) sont dissous dans 20 ml de toluène anhydre et ajoutés goutte à goutte au mélange (les polyoxypropylènes de basse masse moléculaire sont couramment appelés " polypropylene glycol "). La réaction est poursuivie toute une nuit (environ 15 heures) à 5°C (la bande isocyanate décroît à partir du début de la réaction pour se stabiliser ensuite). 80 ml de toluène sont ajoutés au mélange afin de diminuer la viscosité de la solution et le polymère est précipité à l'aide de 550 ml d'éther de pétrole, filtré sur verre fritté n° 4, lavé avec un excès d'éther de pétrole et séché sous vide.

EXEMPLE 7 :

Détermination du comportement thermoépaississant d'un copolymère PVA-NIPAM et d'un copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP.

Le rhéomètre utilisé dans cet exemple est identique à celui mis en oeuvre dans l'exemple 3 précédent. Le PVA-NIPAM mis en œuvre correspond à celui du tableau 3 et le copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP est celui préparé en exemple 6.

En figure 9 sont représentés les comportements rhéologiques de milieux comprenant

- respectivement 4,5 % en poids de PVA-NIPAM ou 4,75 % en poids de PVA dissous dans un électrolyte 50 mM TRIS-TAPS (figure 9a). On note que le copolymère PVA-NIPAM présente un caractère thermoépaississant à partir d'une température supérieure à 35°C , que ne présente pas le PVA seul.

et

- le caractère thermoréticulant du copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP qui épaissit rapidement au delà d'une température de 20°C (figure

9b). Figure également sur ce graphe le comportement rhéologique du polymère polyéthylène glycol à même concentration. Dans ce cas on ne note aucune augmentation de la viscosité en fonction de la température.

EXEMPLE 8 :

Propriétés de séparation d'un milieu de séparation électrophorétique comprenant un copolymère PVA-NIPAM selon l'exemple 5.

La détection par fluorescence se fait dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 4. En ce qui concerne le canal capillaire il a une longueur totale de 40 cm et une longueur efficace de 30 cm, un diamètre interne de 100 μm et il est revêtu d'un dérivé d'acrylamide selon le procédé décrit dans par HJERTEN J. Chromatogr., 1985, 347, 191 afin de supprimer l'électroosmose.

L'électrolyte comprend 4,75 g/100ml du copolymère PVA-PNIPAM et 50 mM de tampon TRIS TAPS.

Le champ électrique est de 200 volts par centimètre. L'injection est réalisée en 10 secondes à 200 volts par centimètre. L'échantillon est le sizer 50-500, Pharmacia Biotech, dilué à 1/500 dans de l'eau MILLI Q (Miliport).

Les propriétés séparatrices sont appréciées à deux températures, 20°C (figure 10a) et 44°C (figure 10b). Le temps de séparation est amélioré, mais la résolution n'est pas augmentée de façon notable, ce qui est sans doute dû à la trop faible viscosité atteinte à 44°C pour ce milieu.

EXEMPLE 9:

Propriétés séparatrices d'un milieu de séparation comprenant à titre de copolymère un copolymère tribloc POP-POE-POP selon l'exemple 8.

Le milieu a été testé dans les conditions préconisées pour le milieu décrit en exemple 7 précédemment.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11.

La figure 11a rend compte des propriétés séparatrices du milieu témoin c'est-à-dire à base simplement de polyéthylène glycol non modifié, à 20°C. La figure 11b rend compte des propriétés séparatrices d'un milieu comprenant le copolymère POP-POE-POP à une température de 20°C par

analogie au milieu témoin et la figure 11c illustre les propriétés séparatrices d'un milieu à base dudit copolymère mais à une température de 50°C. Ceci montre que le copolymère présente dès la température ambiante une résolution supérieure à celle obtenue avec le POE seul, sans doute à cause de sa masse moléculaire supérieure, mais que les propriétés sont encore grandement améliorées quand on passe à 50°C, et montre que les polymères du type séquencé présentant au moins deux blocs à LCST peuvent également être utilisés avantageusement dans le cadre de l'invention pour effectuer des séparations électrocinétiques.

EXEMPLE 10 :

Préparation d'un copolymère chargé PAAgNIPAM (Acide Polyacrylique/Poly-N-Isopropylacrylamide).

L'acide polyacrylique utilisé est en solution à 12,5 g/100ml dans l'eau. Le polymère noté PAA500 a une masse molaire moyenne en poids de 500 000 g/mol (Fluka)

Le squelette du PAA500 est sensible au pH ; les fonctions carboxyliques ionisables ont un pK_0 aux alentours de 4,25 unités pH.

1) Synthèse du copolymère PAAgNIPAM

a) Mode opératoire

La voie de synthèse suivie consiste à greffer de courtes chaînes de NIPAM sur une fraction faible des fonctions acide carboxylique d'un squelette d'acide polyacrylique. Elle se décompose en deux temps :

Synthèse d'oligoNIPAM, courte chaîne de PNIPAM ($M_w \approx 2\,000$ g/mol) terminée par une fonction amine, et ce par polymérisation radicalaire de monomères NIPAM dans le méthanol en présence de l'agent de transfert AET, HCl (2-aminoéthanthiol hydrochloré) et de l'initiateur AIBN (2,2'-azobis(2-aminoéthanol) nitrile) à 60°C pendant 20 heures. (ce mode de synthèse constitue une alternative à celui, en solution aqueuse, utilisé pour préparer les polymères PNIPAM-A dans l'exemple 1).

On effectue ensuite le greffage des oligoNIPAM de longueur connues sur le squelette PAA500 réaction entre groupes fonctionnels acides et amines en présence d'un amorceur podiimide :

- soit dans l'eau à 60°C pendant 1 heure (amorceur EDC 1,2 dichloroéthane),

- soit dans la N-Méthylpyrrolidone (NMP) à 60°C pendant 24 heures (amorceur DCCI dicyclocarbodiimide).

Le tableau 4 rend compte de la composition du copolymère PAAgNIPAM obtenu par ce protocole.

10

Tableau 4:

Synthèse dans l'eau du PAAgNIPAM I		
	m(g) ou V (ml)	n (mmol)
OligoNIPAM	1,7g	0,7
PAA500	3g	
Amorceur	0,575g	3
Solvant	250 ml	
Copolymère		
m (g)	4,58	
taux de greffage ^a	18	

^a % en poids de NIPAM déterminé par RMN.

15

EXEMPLE 11 :

Comportement rhéologique du copolymère PAAgNIPAM I.

L'évolution de la viscosité en fonction de la température a été tracée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 6 ci dessus mis à part

l'utilisation d'un gradient de cisaillement de 100 s⁻¹ et d'une vitesse de montée en température de 2°C par minute. L'effet thermoépaississant apparaît à 33°C

pour le PAAgNIPAM I et se prolonge jusqu'à 65°C, ne présentant sur cette gamme de température qu'une phase de croissance et l'amorce d'un palier. Ceci montre qu'à l'aide des exemples et descriptions données ci-dessus, il est également possible de préparer des copolymères présentant un squelette hydrophile chargé et une multiplicité de blocs à LCST donnant lieu à une thermoréticulation et utilisables dans le cadre de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Milieu thermosensible pour la séparation d'espèces au sein d'un canal de séparation, ledit milieu comprenant un électrolyte dans lequel est dissous au moins un ensemble de copolymère blocs caractérisé en ce que
5 lesdits copolymères blocs :
 - sont présents dans ledit électrolyte à une concentration suffisante pour conférer audit milieu la faculté de transiter réversiblement d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100 % à V1, obtenu à une température T2 supérieure
10 d'au moins 20°C à T 1 et
 - comprennent dans leur structure au moins
 - deux segments polymériques non-contigus présentant dans ledit électrolyte une LCST et possédant un nombre moyen d'atomes le long de leur squelette supérieur à 50 et
 - 15 - un segment polymérique soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.
2. Milieu selon la revendication 1 caractérisé en ce que la température T1 est comprise entre 15° et 30°C.
- 20 3. Milieu selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la température T2 est comprise entre 40°C et 80°C.
4. Milieu selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la viscosité V2 est supérieure d'au moins un facteur égal à 5 à la viscosité V1.
- 25 5. Milieu selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la LCST d'une fraction significative desdits segments à LCST est comprise entre T1 et T2.
6. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'ensemble des segments à LCST représentent entre 2 %
30 et 25 % et de préférence entre 5 et 15 % de la masse molaire totale moyenne des copolymères.
7. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie des blocs à LCST possèdent le long de leur

squelette un nombre moyen d'atomes supérieur à 75, ou une masse moléculaire moyenne supérieure à 2 500.

8. Milieu selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que ce tout ou partie desdits polymères se présentent sous la forme de polymères linéaires séquencés.

9 Milieu selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que tout ou partie desdits polymères se présentent sous la forme de copolymères en peigne dont le squelette est constitué par un ou plusieurs segments solubles dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.

10 10. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possèdent un nombre moyen de segments à LCST par chaîne supérieur à 2 et de préférence supérieur à 5.

11. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possède une masse moléculaire supérieure à 30 000 ou un nombre d'atome le long du squelette principal supérieur à 2 000.

12 Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possède une masse moléculaire comprise entre 50 000 et 3 000 000 ou un nombre d'atome le long du squelette principal compris entre 2 500 et 100 000.

13. Milieu selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possède un nombre moyen d'atomes le long d'une section de segment soluble, comprise entre deux points de liaison consécutifs dudit segment soluble avec des segments à LCST, supérieur à 210.

14. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie desdits segments polymériques à LCST dérivent d'un ou plusieurs polymères choisis parmi :

- les polyvinylalkyléther,
- les hydroxyalkylcelluloses,
- les homopolymères d'étheroxydes,
- les copolymères statistiques et séquencés d'étheroxydes,

- les homo- et co-polymères alkylènes, et

- les dérivés polyacryliques dérivant de l'homopolymérisation ou co polymérisation de monomères choisis parmi les acides acrylique et méthacrylique, les acrylates et méthacrylates d'alkyle, les N-alkyl-acrylamides ou
5 -méthacrylamides, les N,N- dialkyl -acrylamides ou -méthacrylamides, les aryl-
acrylamides ou -méthacrylamides et les alkylaryl-acrylamides ou
-méthacrylamides.

15. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le ou les segments polymériques solubles aux
10 températures T1 et T2 sont constitués d'au moins un polymère choisi parmi les
polyéthers, polyesters, les homopolymères et copolymères statistiques solubles
du type polyoxyalkylène, les polysaccharides, l'alcool polyvinylique, la
polyvinylpyrrolidone les polyuréthanes, les polyamides, les polysulfonamides, les
polysulfoxydes, le polystyrènesulfonate, les polyacrylamides et
15 polyméthacrylamides substitués ou non solubles dans ledit électrolyte.

16. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le copolymère est choisi parmi :

- les copolymères du type copolymère en peigne dont le squelette
est de type acrylamide, acide acrylique, acryloylaminoéthanol ou
20 diméthylacrylamide et au niveau duquel sont greffées des segments latéraux de
type poly(N-alkyl ou N,N dialkyl)acrylamide, de type polyoxypropylène ou
copolymère polyoxyéthylène/propylène, statistique ou séquencé, ou de type
polyéther et

- les copolymères du type copolymère séquencé et présentant le
25 long de leur squelette une alternance de segments de type polyoxyéthylène et de
segments de type polyoxypropylène, ou une alternance de segments de type
polyoxyéthylène et de segments de type polyoxybutylène ou une alternance de
segments de polyéthylène et de segments de type polyéther plus hydrophobes
que le polyoxyéthylène.

30 17. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le copolymère est choisi parmi

les polyacrylamide/poly(N-isopropylacrylamide) (PAM-NIPAM) ;
polyvinylalcool/poly(N-isopropyl- acrylamide) (PVA-NIPAM) ,

polyoxyéthylène/polyoxypropylène, polyacrylamide/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, polyacrylamide/polyoxypropylène, acide polyacrylique/polyoxypropylène, acide polyacrylique/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, acide polyacrylique/poly(N-isopropylacrylamide) et polydiméthylacrylamide/ poly(N-isopropyl- acrylamide) (PDMAM-NIPAM).

18. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il transite d'une viscosité $V1$ comprise entre 50 et 1000 mPa $m^{-1} s^{-1}$ (unité SI) à une température $T1$ comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité $V2$ supérieure à $V1$ d'un facteur compris entre 2 et 50 à une température $T2$ de l'ordre de 40°C ou supérieure et en ce qu'il comprend entre 5 g/100ml et 20 g/100ml de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 30 000 et 2 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal (est compris entre 1 000 et 60 000,

- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2 % et 20 %, et

- une masse moléculaire moyenne des segments à LCST comprise entre 2 000 et 20 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST compris entre 35 et 350.

19. Milieu selon l'une des revendications 1 à 17 caractérisé en ce qu'il transite d'une viscosité $V1$ comprise entre 100 et 10 000 mPa $m^{-1} s^{-1}$ à une température $T1$ comprise entre 15 et 30° vers une viscosité $V2$ supérieure à $V1$ d'un facteur compris entre 2 et 100 à une température $T2$ de l'ordre de 40°C ou supérieure et en ce qu'il comprend entre 1 g/100ml et 8 g/100ml de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 500 000 et 3 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 7 000 et 90 000,

- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2,5 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne de segments à LCST comprise entre 4 000 et 30 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST compris entre 60 et 600.

20. Milieu selon l'une des revendications 1 à 17 caractérisé en ce qu'il transite d'une viscosité V_1 comprise entre 100 et 10 000 mPa $\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ (unité SI) à une température T_1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V_2 supérieure à V_1 d'un facteur compris entre 2 et 100 à une température T_2 de l'ordre de 40°C ou supérieure et en ce qu'il comprend entre 0,1 g/100ml et 5 g/100ml de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne supérieure à 500 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 7 000,

- une fraction en masse de segments à LCST comprise entre 2 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne des segments à LCST supérieure à 4 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un segment à LCST supérieur à 90.

21. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit copolymère est présent dans ledit milieu et la concentration en copolymère est inférieure à 20g/100ml, et de préférence comprise entre 0,1g/100ml et 8 g/100 ml.

22. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte en outre des adjuvants de type particules, polymères hydrosolubles, polymères associatifs non thermoépaississants, ou encore agents de surface, neutres ou ioniques.

23. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications précédentes pour la séparation ou l'analyse d'espèces choisies parmi des espèces moléculaires ou macromoléculaires, et en particulier des macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les analogues d'acides nucléiques obtenus par synthèse ou modification chimique, les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides, des molécules organiques, des macromolécules synthétiques ou des particules telles que des particules minérales, de latex, des cellules ou des organelles.

24. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 22 pour le séquençage d'ADN.

25. Utilisation selon la revendication 24 caractérisée en ce que pour séparer des molécules de masse moléculaire inférieure à 50 000 ou des oligonucléotides comprenant moins de 100 nucléotides, ou encore des protéines natives ou dénaturées, on utilise un milieu selon la revendication 18.

5 26. Utilisation selon la revendication 24 ou 25 caractérisée en ce que pour séparer des produits de réaction de séquence d'ADN, des ADN duplex de moins de 1000 paires de bases, des protéines dénaturées ou des polymères synthétiques ou naturels de masse moléculaire comprise entre 20 000 et 1 000 000, on utilise un milieu selon la revendication 19.

10 27. Utilisation selon la revendication 24 caractérisée en ce que pour séparer des ADN duplex de taille comprise entre 500 bases et plusieurs millions de paires de bases, ou des particules telles que des latex, des cellules entières, des chromosomes entiers ou des organelles, on utilise un milieu selon la revendication 20.

15 28. Utilisation selon l'une des revendications 24 à 27, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- la sélection dudit milieu de séparation en fonction des caractéristiques des espèces à séparer ;

- l'introduction de ce milieu dans un canal de séparation d'appareil d'électrophorèse en une quantité suffisante pour en constituer le milieu de séparation, ledit canal de séparation étant maintenu à une température voisine de la température T1 ;

- la mise à la température T2 d'une portion significative du canal soit préalablement ou consécutivement à l'introduction d'un échantillon ;

25 - l'introduction à l'entrée du canal de séparation d'une quantité d'échantillon ;

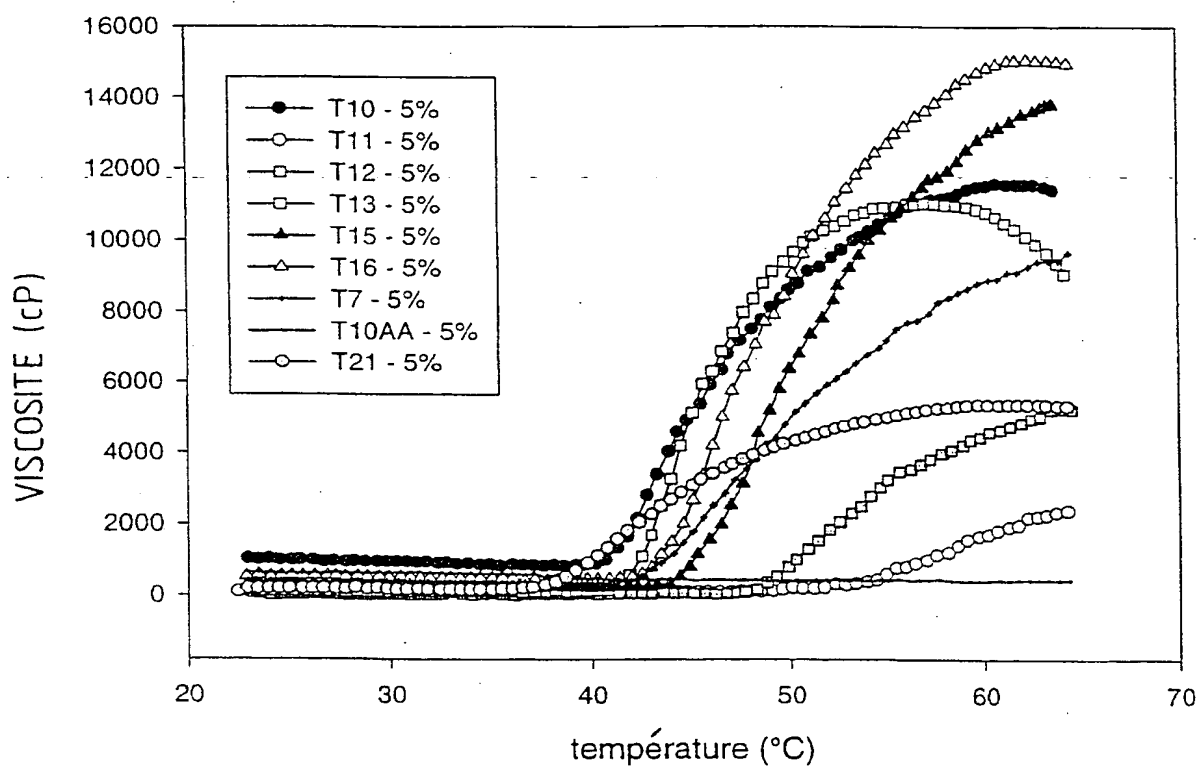
- la réalisation de la séparation à une température de l'ordre de T2 dans la portion du canal thermostatée et

30 - la détection de la migration des analytes initialement contenus dans l'échantillon.

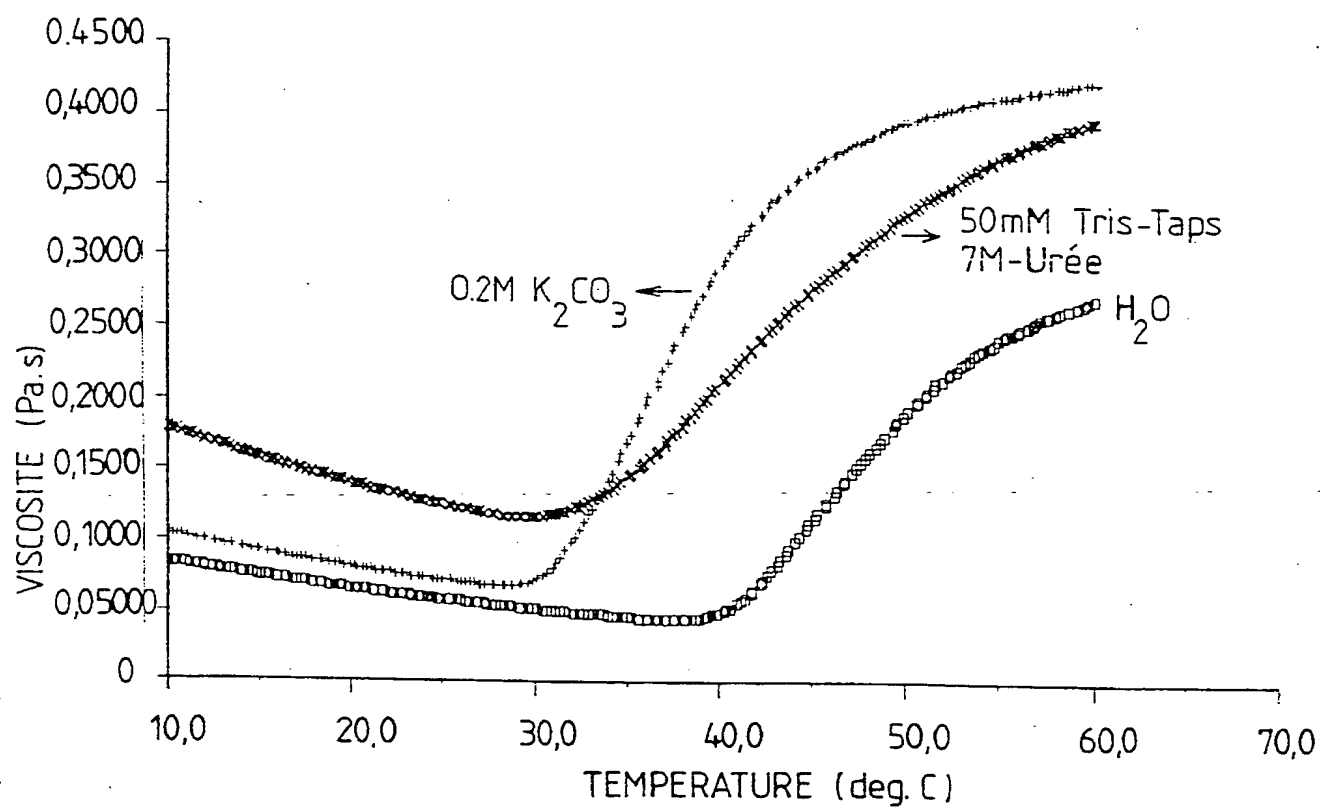
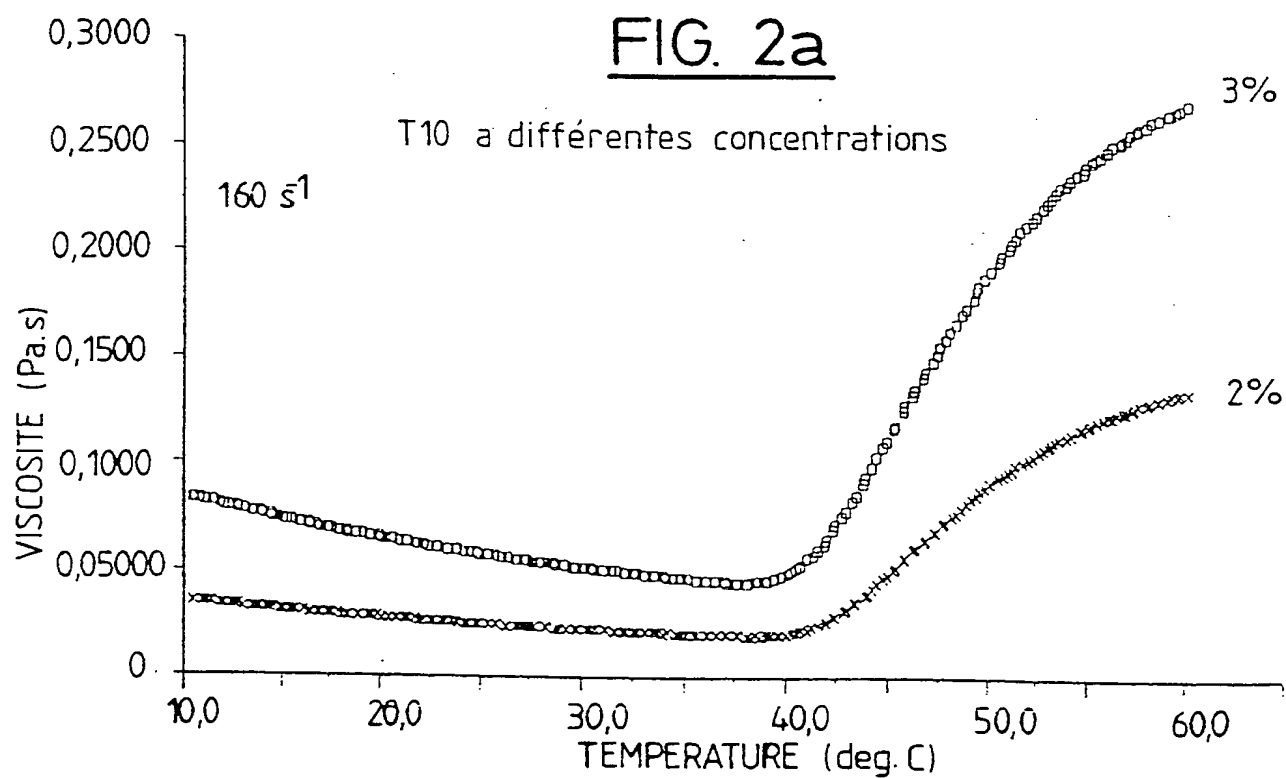
29. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 23 dans un appareil d'électrophorèse automatisé.

30. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 23 au sein d'un système microfluidique.

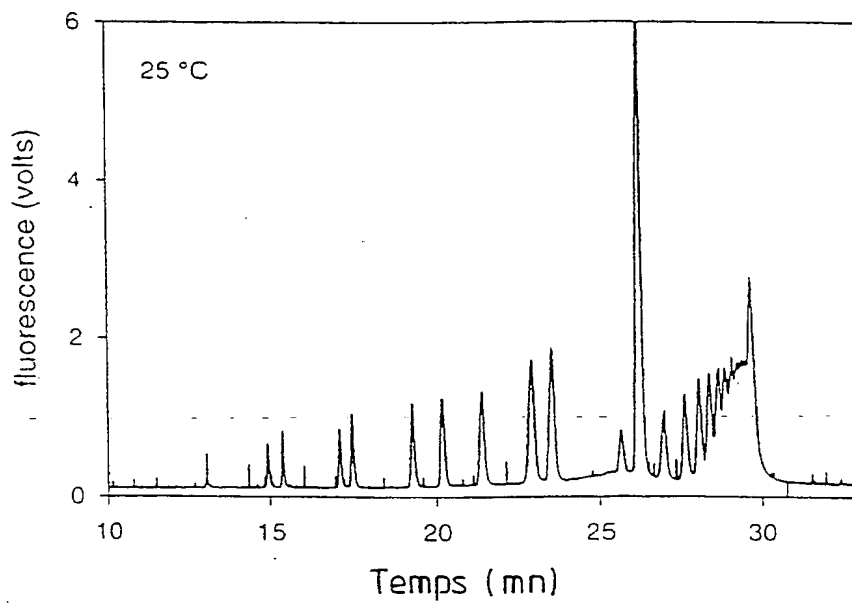
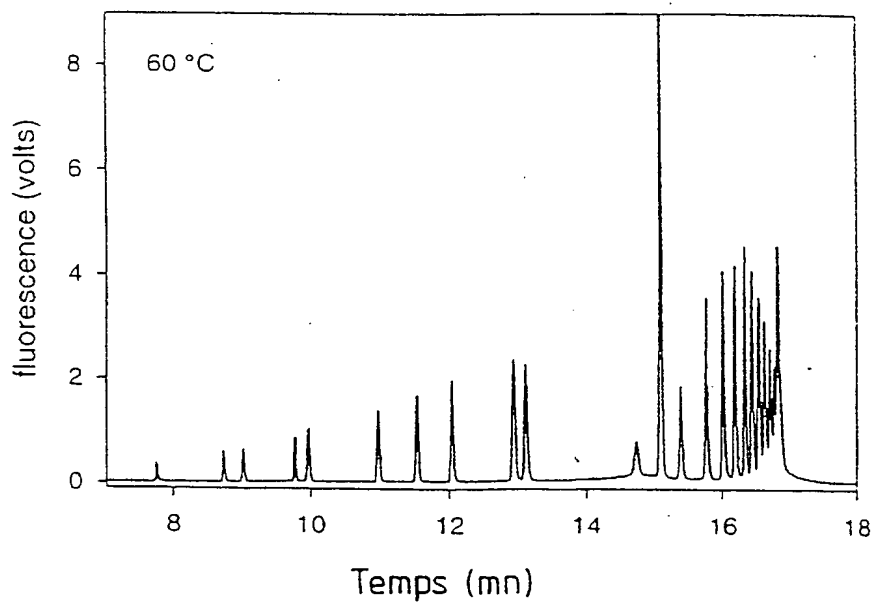
31. Dispositif d'électrophorèse capillaire comprenant à titre de milieu de séparation un milieu selon l'une des revendications 1 à 23.

FIG.1

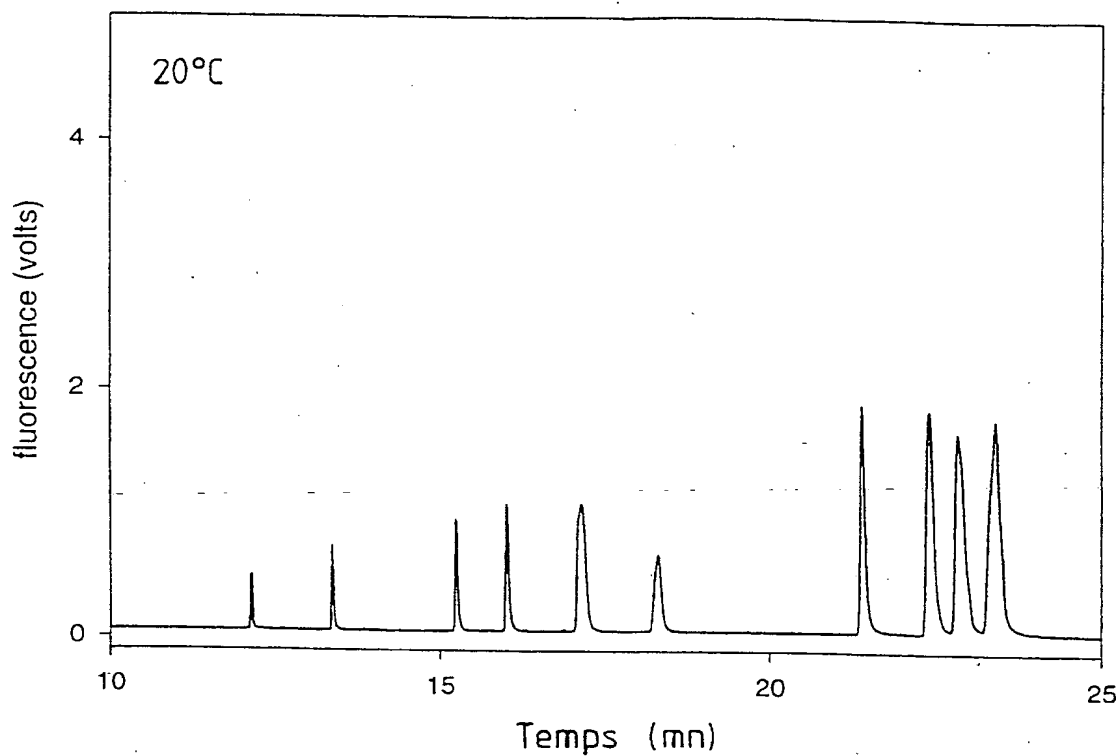
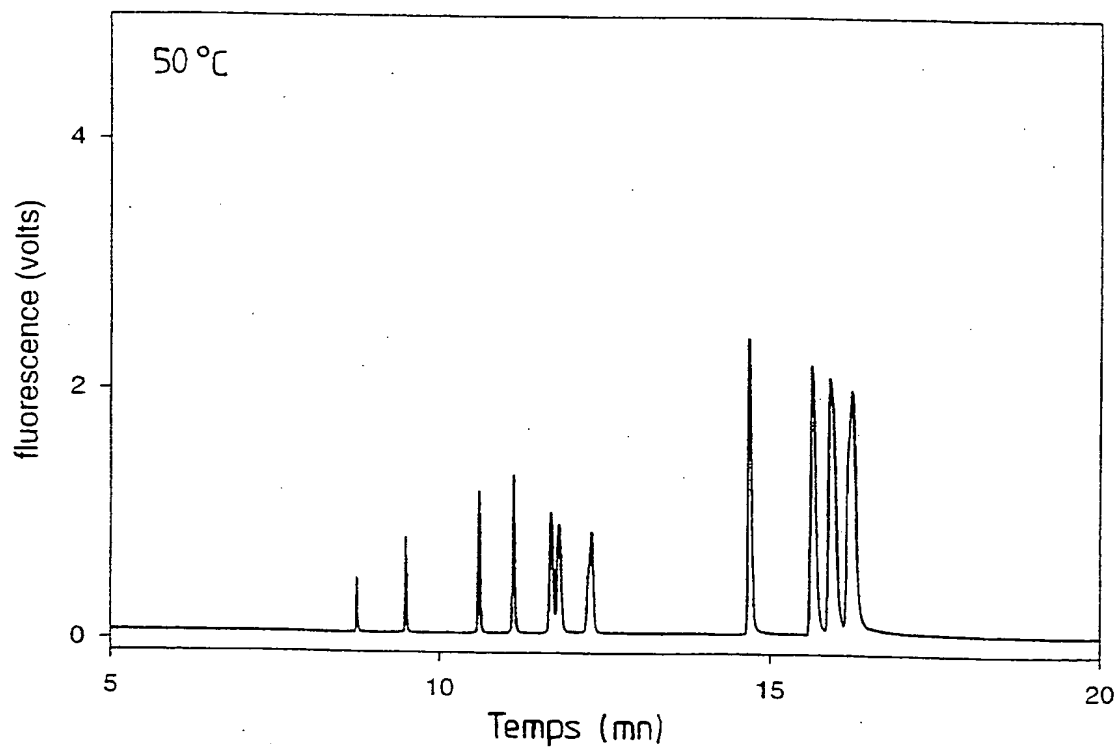
2/12

FIG. 2aFIG. 2b

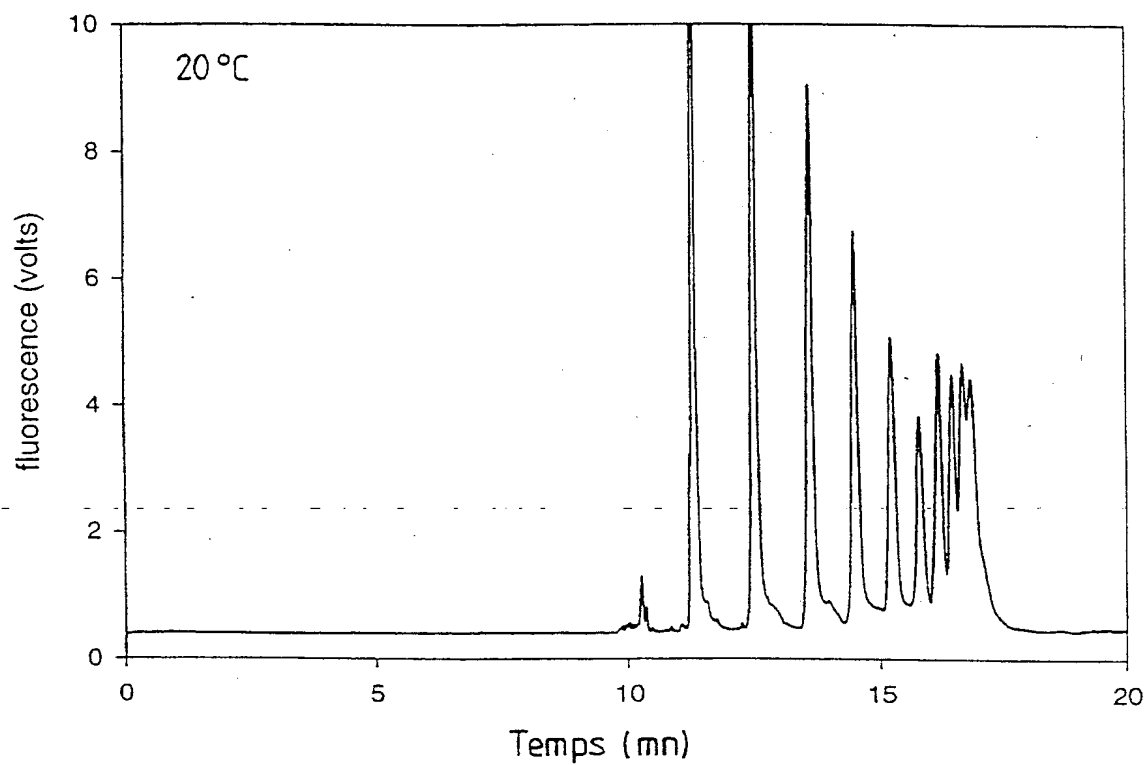
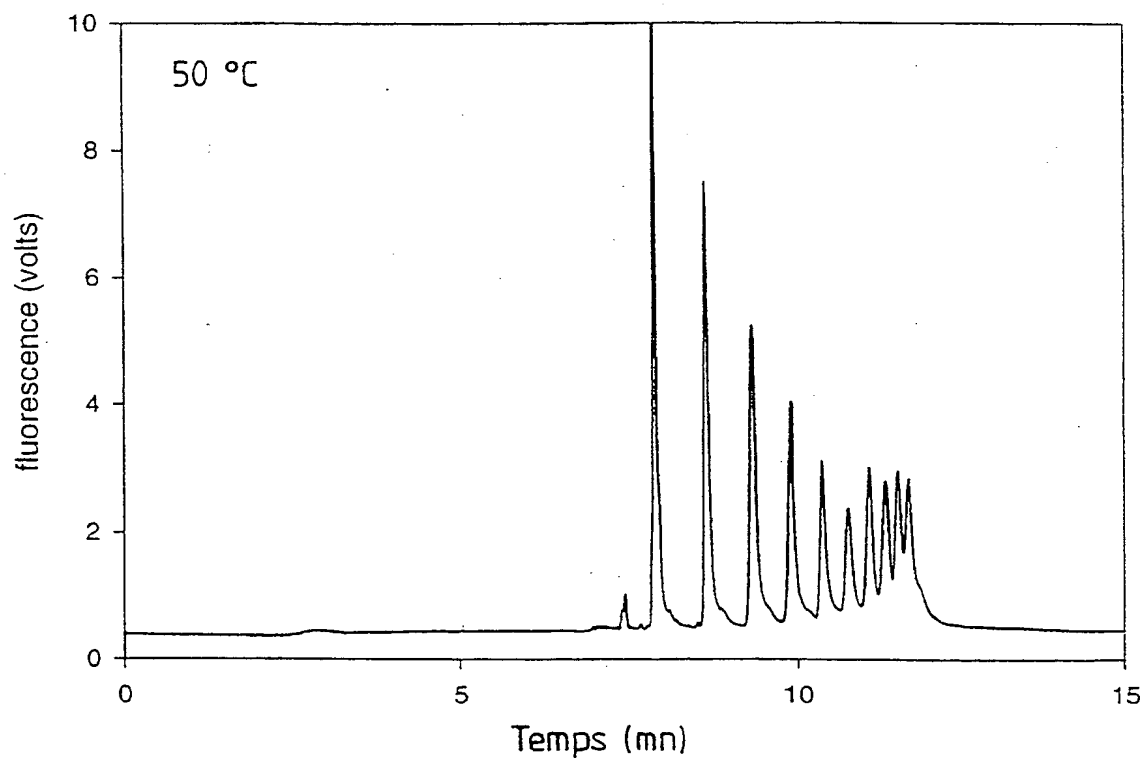
3/12

FIG. 3aFIG. 3b

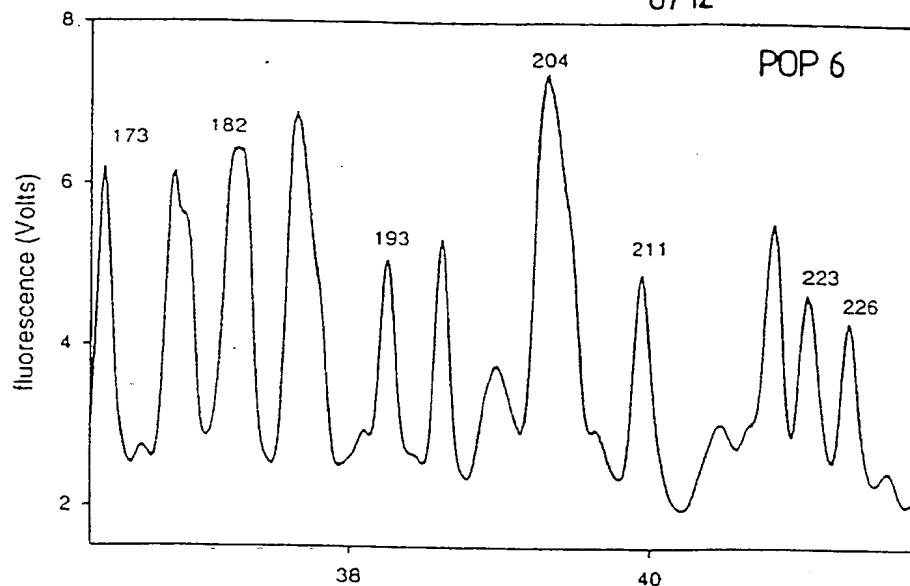
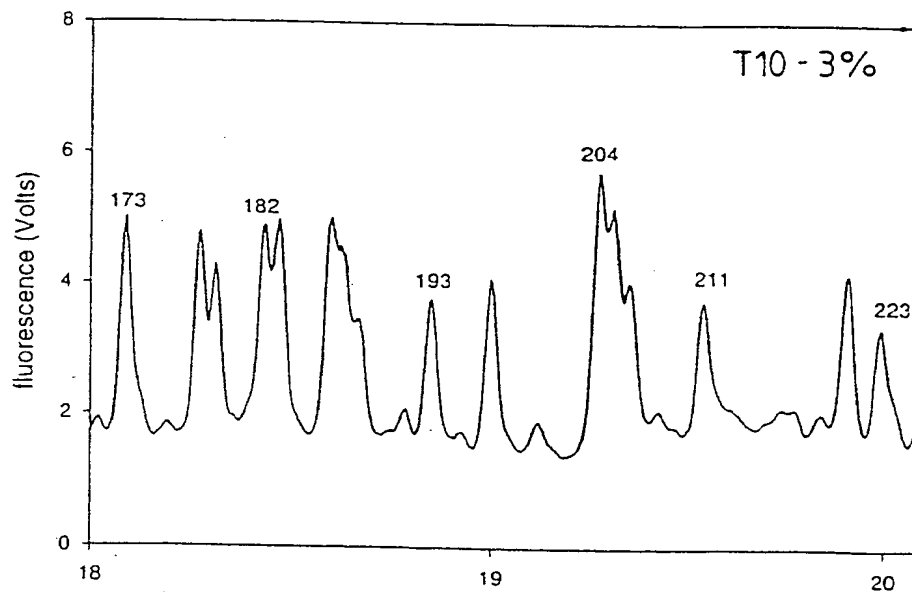
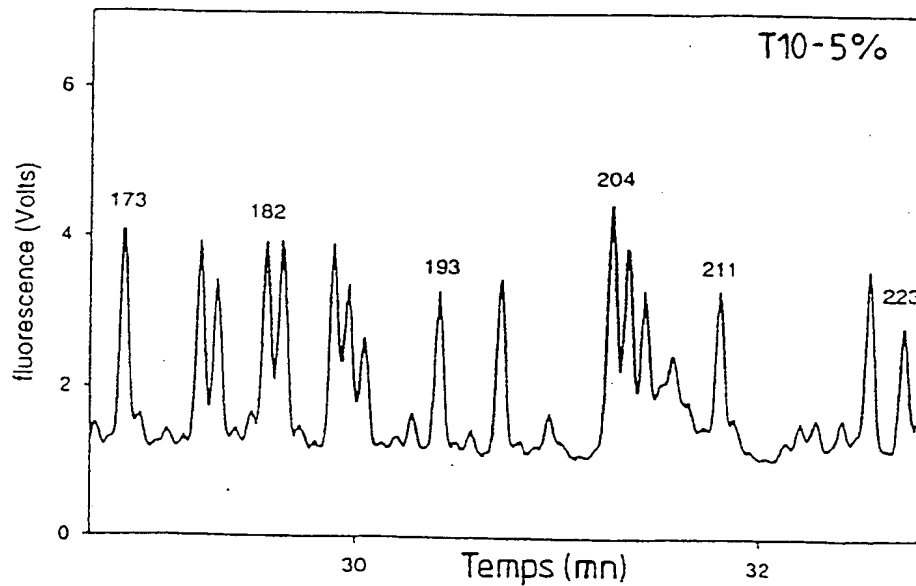
4 / 12

FIG. 4aFIG. 4b

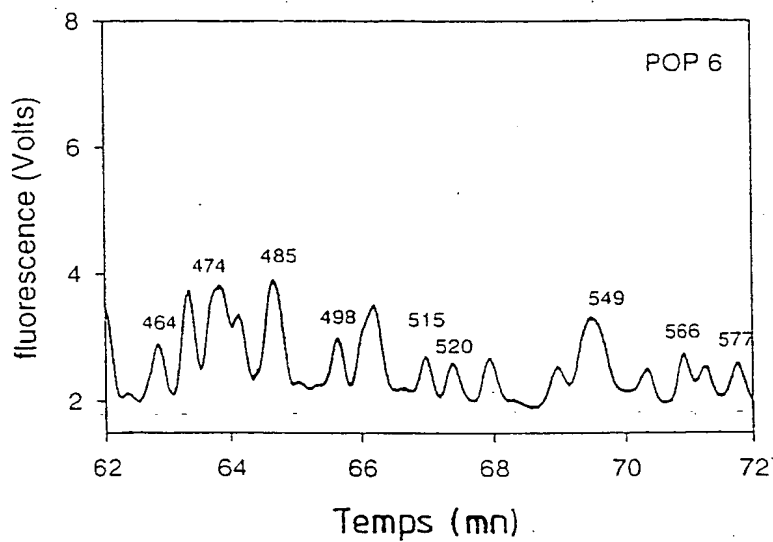
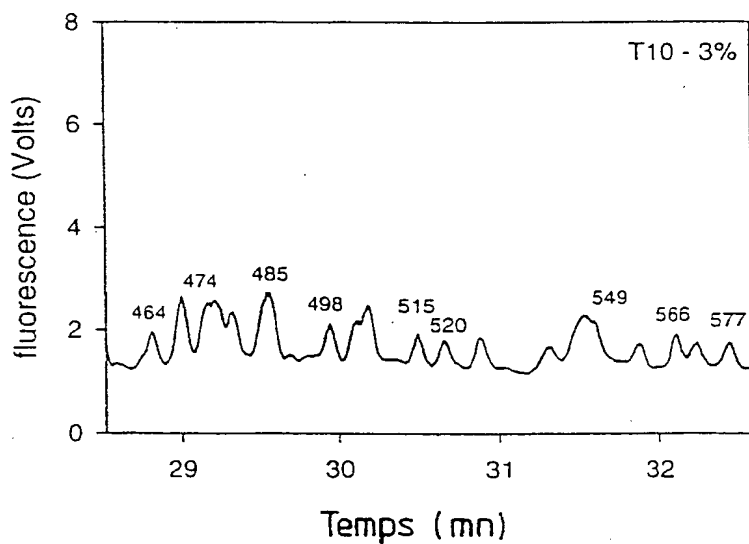
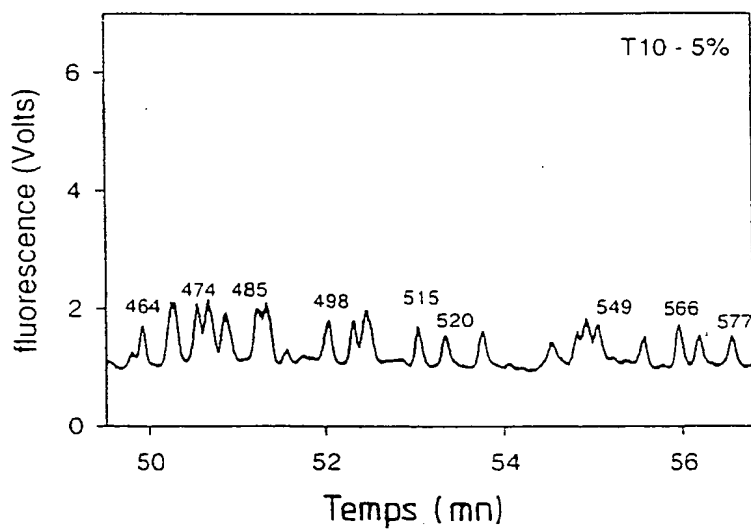
5/12

FIG. 5aFIG. 5b

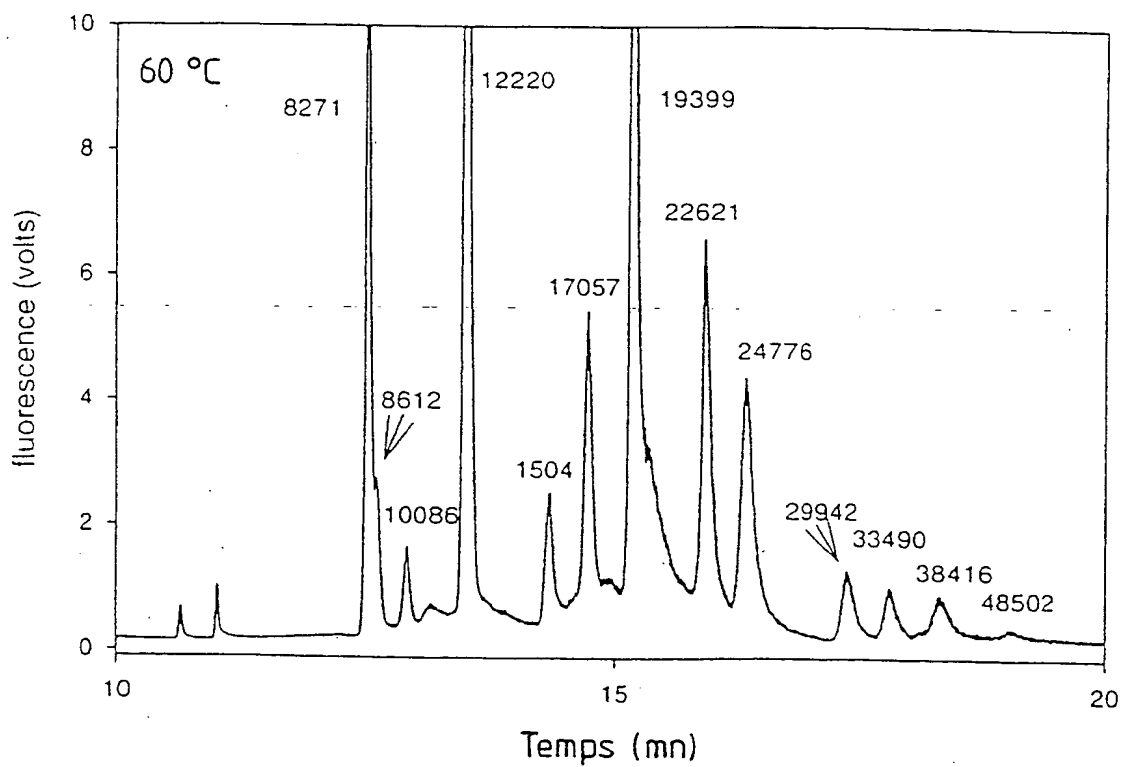
6/12

FIG. 6aFIG. 6bFIG. 6c

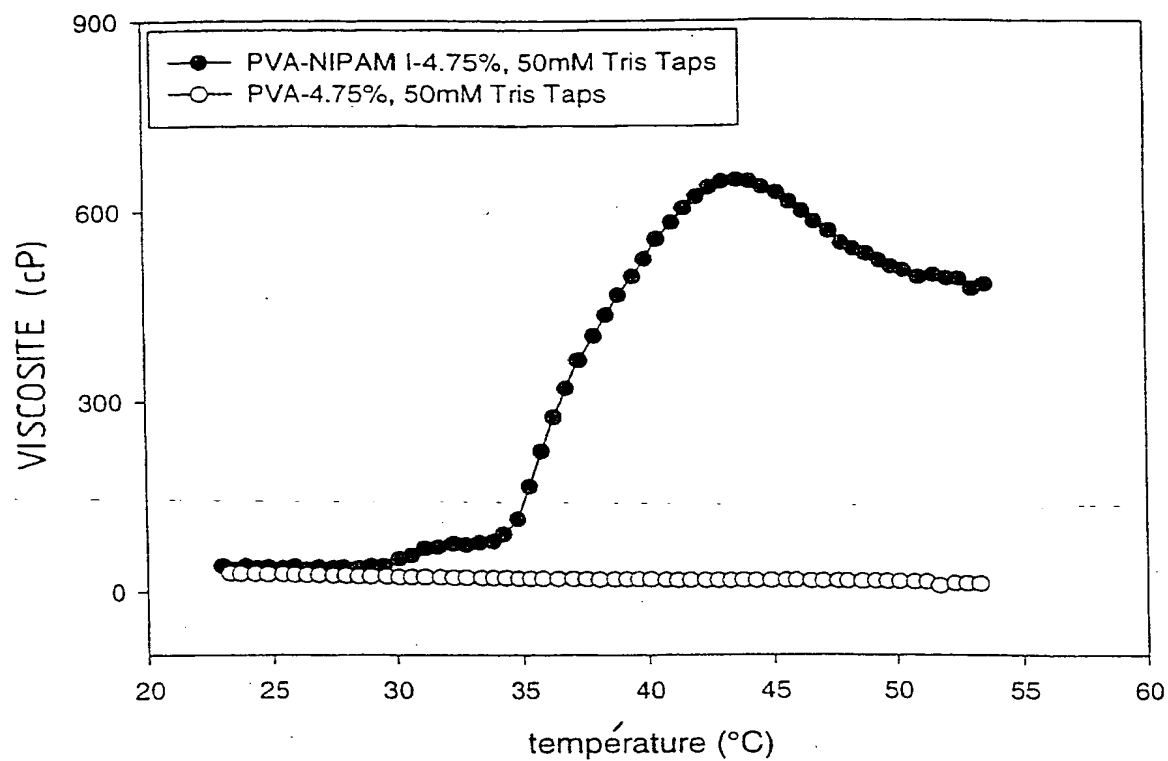
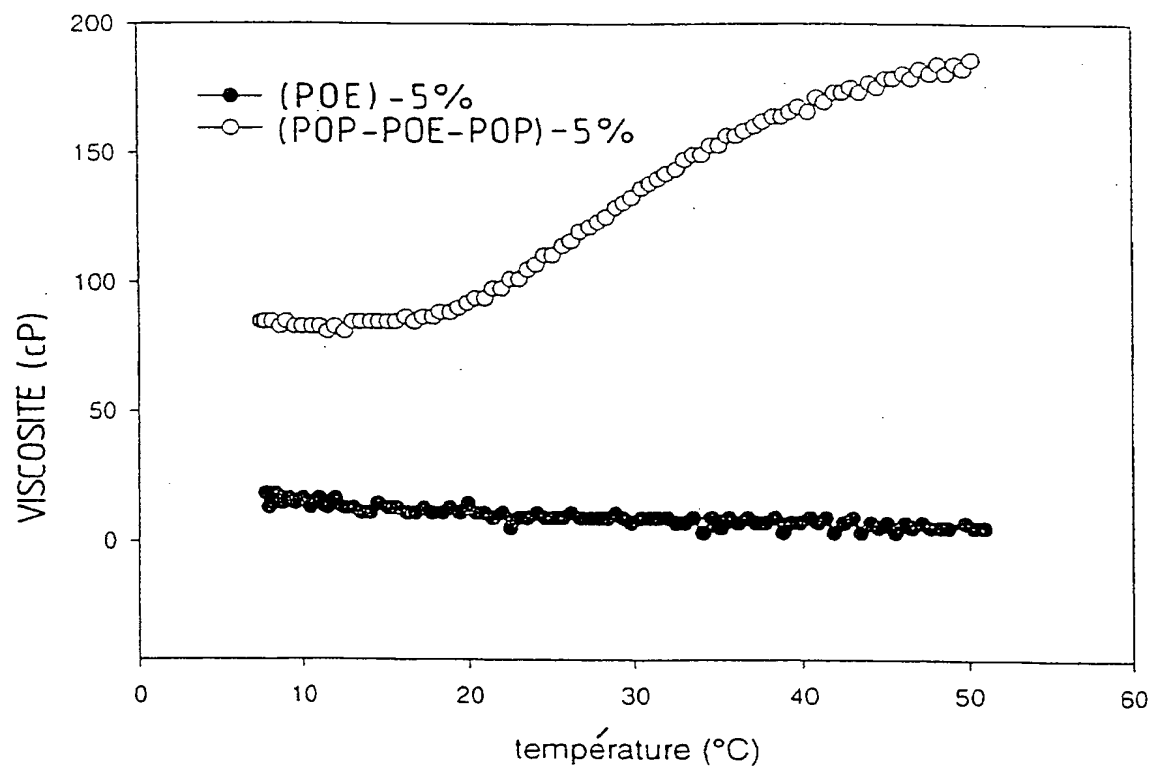
7/12

FIG. 7aFIG. 7bFIG. 7c

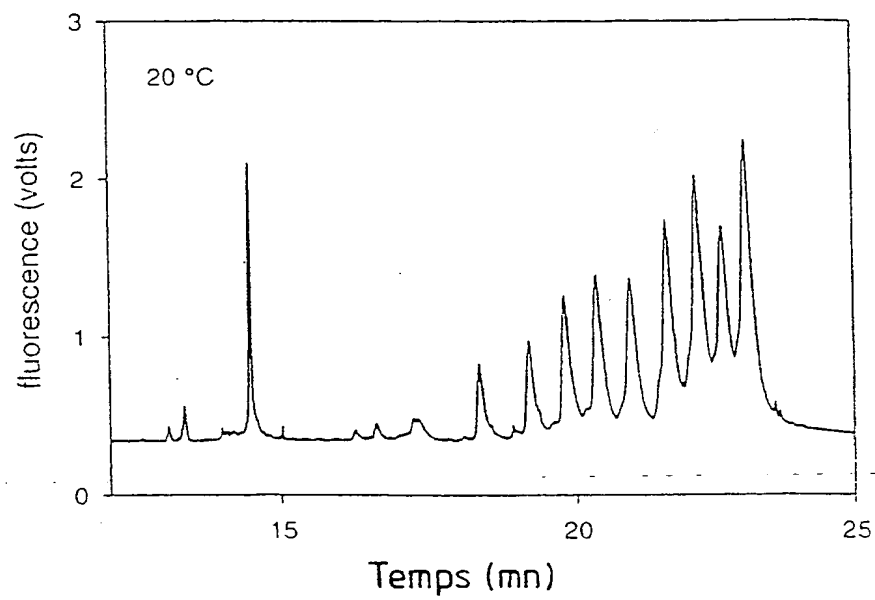
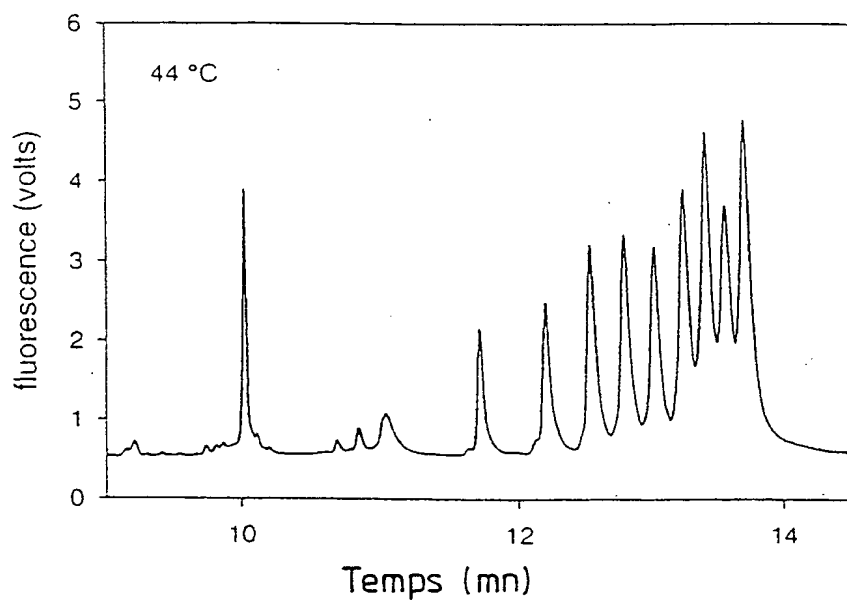
8/12

FIG. 8

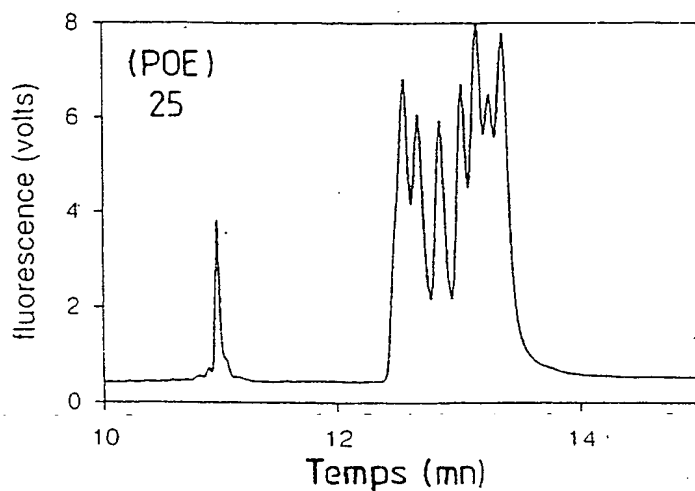
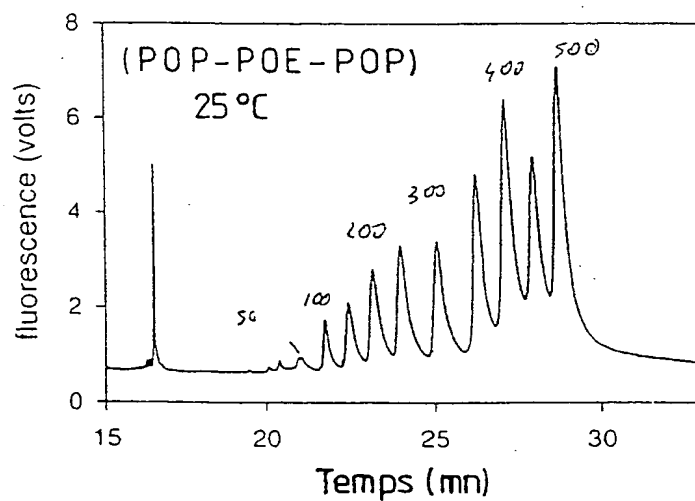
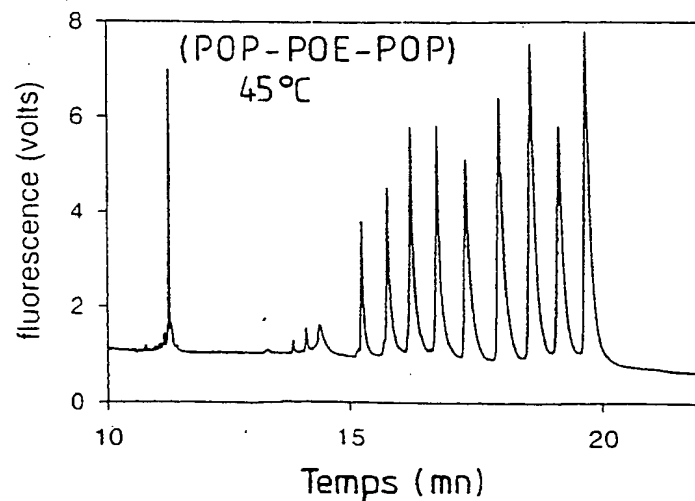
9 / 12

FIG.9aFIG.9b

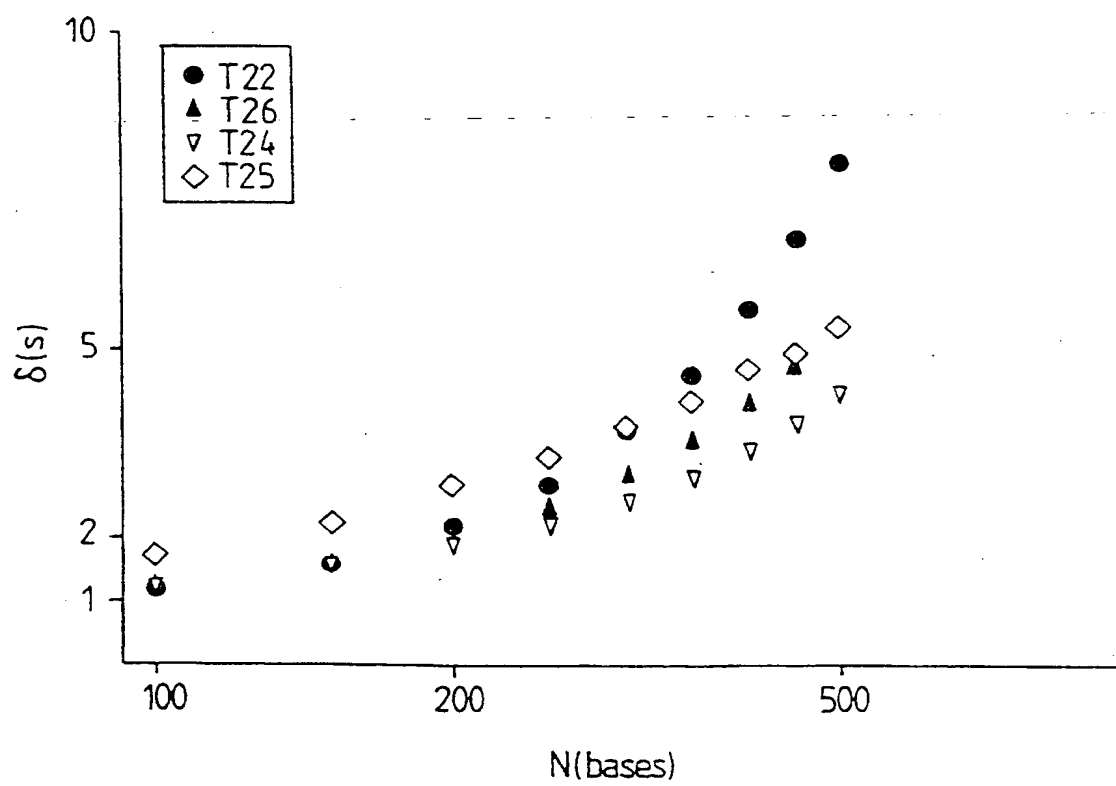
10/12

FIG. 10aFIG. 10b

11/12

FIG. 11aFIG. 11bFIG. 11c

12 / 12

FIG.12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Ion. Application No

PCT/FR 99/03304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 10274 A (UNIV NEW YORK) 12 March 1998 (1998-03-12) cited in the application page 28, line 13 - line 19 ---	1, 23, 30, 31
Y	WO 97 09400 A (CHARMOT DOMINIQUE ; ADAM HERVE (FR); CORPART PASCALE (FR); RHONE PO) 13 March 1997 (1997-03-13) cited in the application abstract ---	1, 23, 30, 31
A	WO 95 30782 A (SOANE BIOSCIENCES ; SOANE DAVID S (US); BAE YOUNG CHAN (KR); HOOPER) 16 November 1995 (1995-11-16) cited in the application page 6, line 1 - line 6 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 2000

Date of mailing of the international search report

11/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ion Application No
PCT/FR 99/03304

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L'ALLORET F ET AL: "REVERSIBLE THERMOASSOCIATION OF WATER-SOLUBLE POLYMERS" REVUE DE L'INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE, vol. 52, no. 2, March 1997 (1997-03), pages 117-128, XP000703457 cited in the application the whole document ---	1
A	HOURET D ET AL: "Synthesis of thermoassociative copolymers" POLYMER, vol. 38, no. 10, May 1997 (1997-05), page 2535-2547 XP004059755 cited in the application the whole document ---	1
A	D. HOURET: "THERMOTHICKENING POLYELECTROLYTES" POLYMER PREPRINTS, vol. 34, no. 1, 1993, pages 972-973, XP002100609 cited in the application the whole document ---	1
A	EP 0 583 814 A (PUMPTech NV) 23 February 1994 (1994-02-23) cited in the application the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No

PCT/FR 99/03304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9810274 A	12-03-1998	US 6001232 A	14-12-1999
		US 5989399 A	23-11-1999
		AU 4409897 A	26-03-1999
WO 9709400 A	13-03-1997	FR 2738573 A	14-03-1997
		AU 6934896 A	27-03-1997
		EP 0865477 A	23-09-1998
WO 9530782 A	16-11-1995	US 5569364 A	29-10-1996
		AU 2551295 A	29-11-1995
		US 5885432 A	23-03-1999
EP 0583814 A	23-02-1994	FR 2694939 A	25-02-1994
		CA 2105184 A	21-02-1994
		DE 69321675 D	26-11-1998
		DE 69321675 T	11-03-1999
		JP 6206954 A	26-07-1994
		NO 932955 A	21-02-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PCT/FR 99/03304

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N27/447

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 98 10274 A (UNIV NEW YORK) 12 mars 1998 (1998-03-12) cité dans la demande page 28, ligne 13 - ligne 19 ---	1, 23, 30, 31
Y	WO 97 09400 A (CHARMOT DOMINIQUE ; ADAM HERVE (FR); CORPART PASCALE (FR); RHONE PO) 13 mars 1997 (1997-03-13) cité dans la demande abrégé ---	1, 23, 30, 31
A	WO 95 30782 A (SOANE BIOSCIENCES ; SOANE DAVID S (US); BAE YOUNG CHAN (KR); HOOPER) 16 novembre 1995 (1995-11-16) cité dans la demande page 6, ligne 1 - ligne 6 ---	1
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Duchatellier, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le internationale No
PCT/FR 99/03304

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	L'ALLORET F ET AL: "REVERSIBLE THERMOASSOCIATION OF WATER-SOLUBLE POLYMERS" REVUE DE L'INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE, vol. 52, no. 2, mars 1997 (1997-03), pages 117-128, XP000703457 cité dans la demande le document en entier	1
A	HOURET D ET AL: "Synthesis of thermoassociative copolymers" POLYMER, vol. 38, no. 10, mai 1997 (1997-05), page 2535-2547 XP004059755 cité dans la demande le document en entier	1
A	D. HOURET: "THERMOTHICKENING POLYELECTROLYTES" POLYMER PREPRINTS, vol. 34, no. 1, 1993, pages 972-973, XP002100609 cité dans la demande le document en entier	1
A	EP 0 583 814 A (PUMPTECH NV) 23 février 1994 (1994-02-23) cité dans la demande le document en entier	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

De de internationale No

PCT/FR99/03304

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9810274 A	12-03-1998	US 6001232 A	14-12-1999
		US 5989399 A	23-11-1999
		AU 4409897 A	26-03-1999
WO 9709400 A	13-03-1997	FR 2738573 A	14-03-1997
		AU 6934896 A	27-03-1997
		EP 0865477 A	23-09-1998
WO 9530782 A	16-11-1995	US 5569364 A	29-10-1996
		AU 2551295 A	29-11-1995
		US 5885432 A	23-03-1999
EP 0583814 A	23-02-1994	FR 2694939 A	25-02-1994
		CA 2105184 A	21-02-1994
		DE 69321675 D	26-11-1998
		DE 69321675 T	11-03-1999
		JP 6206954 A	26-07-1994
		NO 932955 A	21-02-1994